

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA
FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACIÓN DE LA ENDOGLINA (CD105) Y VEGF
COMO MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS Y DISEMINACIÓN
EN EL CÁNCER COLORRECTAL**

TESIS DOCTORAL
ANA NOGUÉS PEVIDAL

DIRECTORAS
María Isabel Prieto Nieto
María Luisa Botella Cubells

MADRID, 2017

Universidad Autónoma de Madrid
Hospital Universitario La Paz
Centro de Investigaciones Biológicas – CIB

*A mis padres y a mi hermana, por su apoyo incondicional,
a Alejandro por su infinita paciencia.*

AGRADECIMIENTOS

Gracias, en primer lugar, a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización de mi tesis doctoral, gracias en especial a todas las mujeres que en ella han participado.

Gracias a mis directoras de tesis, la Dra. Isabel Prieto y la Dra. Luisa Botella, porque sin ellas este proyecto no hubiera sido posible, gracias por acompañarme en el largo camino y darme siempre ánimos cuando me fallaban las fuerzas. Gracias Luisa, por compartir conmigo tu enorme sabiduría, por estar siempre disponible para mis dudas y por tu contagioso entusiasmo por la ciencia. Gracias Isabel por ser un gran apoyo desde que nos conocimos, por involucrarme en este proyecto y por todo lo que hemos luchado juntas para que saliera adelante, gracias por todo lo que me has enseñado y cuidado.

Gracias a Mónica, Lucia, Elisabeth, Marta y Marina, porque a pesar de la carga de trabajo del Biobanco, desde el principio hasta el final habéis hecho un magnífico trabajo, siempre con una sonrisa en la cara a pesar de mis listas interminables.

Gracias a M^a Paz y a Eunete, por ser unas excelentes profesionales y su trabajo imprescindible en el análisis molecular, gracias por vuestra colaboración y simpatía.

Gracias a Laura Barrios y Belén Garzón por vuestra colaboración en el análisis estadístico, por ayudarme a darle forma final a mi tesis, siempre dispuestas a mis nuevas ocurrencias.

Gracias a Gemma Domínguez, del Departamento de Bioquímica de la UAM, por sus consejos y correcciones altruistas.

Gracias a todas las personas del Hospital Universitario La Paz que desde el 2013 hasta el 2015 han hecho posible la recogida de muestras, a la Sección de Coloproctología por no ponerme nunca problemas, al Servicio de Anestesia por su recogida de muestras preoperatorias, al Servicio de Anatomía Patológica por su colaboración con la obtención de parafinas y al equipo de enfermería de Hospital de Día de Oncología por la recogida de muestras en el seguimiento. Gracias a los pacientes que han dado su consentimiento y han participado en nuestro estudio.

Gracias a los residentes que sufrieron conmigo el proceso de recogida de muestras, por colaborar en lo que les necesitaba. Especialmente a Luis Tresierra porque me animó a realizar esta tesis doctoral y por todo lo que me ha hecho reír, a Tania porque me adora y yo le adoro y a Paloma por seguir mis pasos con confianza, dispuesta a expresar nuestro conocimiento sobre la Endoglinina.

Gracias a mis chicas de Primera fila y Anexos, que tantas horas hemos pasado fuera y dentro de la Facultad, por lo que hemos llegado a ser y lo que queda.

Gracias a mis amig@s de Zaragoza, en especial a Irene, Paula y Marias, por ser las de siempre y no cambiar, con sus defectos y sus virtudes, pero las de toda la vida, y que así siga mucho tiempo. Gracias a Marga y Raquel por haberos conocido en el momento exacto para teneros siempre cerca, gracias por alegraros siempre con mis avances.

Gracias a mi familia que es el gran pilar de mi vida, gracias a mis padres porque si he llegado hasta aquí es por ellos, por ser la voz de la experiencia y la voz detrás del teléfono que nunca falla en su consejo. Gracias a mi hermana por ser una mujer estupenda y fiel confidente. Muchas gracias a mi abuela, por todo el cariño que me dio y toda la ternura que supo sacar de mí, claro ejemplo de mujer trabajadora y luchadora, gracias por enseñarme a serlo.

Gracias Alejandro, por compartir la vida juntos, porque así es mucho más divertida en los buenos momentos y más llevadera en los malos. Gracias por darle sentido a mi vida.

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es actualmente un importante problema de salud pública por su alta incidencia y mortalidad. Se asocia a una supervivencia del 90% a los 5 años en estadios precoces pero el 20% de pacientes presentará enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico con una supervivencia del 10% a los 5 años. Actualmente el pronóstico y el tratamiento se basan principalmente en el estadio clínico e histopatológico, según el sistema TNM, pero no predice la evolución clínica individual. Durante los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de biología molecular que han demostrado que alteraciones en la expresión génica conducen a la carcinogénesis colorrectal. Los avances en la comprensión de la genética molecular del CCR están siendo muy importantes en el desarrollo de una variedad de biomarcadores de detección temprana, pronóstico y predicción a la respuesta del tratamiento. La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos y es esencial para el crecimiento tumoral maligno, progresión y metástasis, por ello se ha propuesto como un marcador pronóstico en una variedad de tumores malignos y se ha realizado un gran esfuerzo en encontrar marcadores específicos.

En nuestro estudio hemos realizado un análisis molecular e inmunohistoquímico del CCR basándonos en conocidos marcadores de angiogénesis (VEGF y Endogлина), valorando su utilidad como marcadores diagnósticos, de progresión y recurrencia. Nuestra muestra incluye 133 pacientes intervenidos de CCR (40 cáncer de recto y 93 cáncer de colon), de los que recogimos tres tipos de variables: clínicas, anatomopatológicas y moleculares. La Endogлина y el VEGF fueron analizadas como proteínas de membrana en tejido tumoral y no tumoral de la pieza quirúrgica por detección de su expresión de RNA mediante RT-PCR cuantitativa y en su forma soluble en muestras de plasma preoperatorias, a los 3, 6 y 9 meses. Además, la Endogлина fue observada tanto en tejido tumoral como no tumoral por tinción inmunohistoquímica.

En nuestro análisis descriptivo hemos observado una incidencia mayor en los hombres que en las mujeres (63.16% vs 36.84%) y en las personas mayores de 65 años respecto a los menores de 65 años (70.67% vs 29.33%). En el grupo de cáncer de colon un 60.2% de los pacientes se diagnosticaron en estadios menos agresivos y no se encontró correlación con la localización tumoral, a diferencia del grupo de cáncer de recto donde tan sólo un 35% fue diagnosticado en estadios menos agresivos y los tumores en recto medio e inferior representaron el 84.6% de los estadios más agresivos (estadio III y IV). El 100% de los tumores

en esta localización recibieron neoadyuvancia y el 74.1% adyuvancia. Se observó una relación estadísticamente significativa entre los tumores de recto en estadios más agresivos y la aparición de metástasis, así como su presencia en más de una localización. Respecto al grupo global de CCR, 12.78% presentaron metástasis sincrónicas al diagnóstico y un 12.72% metástasis metacrónicas durante el periodo de seguimiento, un 55.17% del total de metástasis se localizaron en el hígado.

En el análisis de las variables moleculares observamos que la expresión génica del VEGF es más fuerte que la de Endogлина en el tejido tumoral de ambos tipos de tumores por lo que puede ser considerado un buen marcador tumoral de angiogénesis en el CCR. Respecto a los niveles solubles en plasma, el VEGF tiende a disminuir en los tumores menos agresivos al contrario que en los tumores más agresivos por lo que podría ser un indicador de la evolución de pacientes con CCR tras la intervención quirúrgica. Respecto a la expresión de Endogлина observada mediante IHQ por tinción específica, se observa una mayor expresión en el endotelio vascular del tejido tumoral en estadios más agresivos, mientras que en estadios menos agresivos su expresión predomina en el epitelio cólico, en las membranas de los túbulos. Esta mayor expresión en el endotelio vascular de tumores agresivos sumada a la existencia de metaloproteasas (específicamente la MMP-14), promueve la escisión de la Endogлина y se traduce en niveles elevados de Endogлина soluble en plasma. La Endogлина soluble en plasma se ha visto aumentada en las muestras preoperatorias de pacientes con metástasis en comparación con las de pacientes sin metástasis por lo que podría ser útil para monitorizar los primeros signos de metástasis.

Como conclusión, ambas moléculas han demostrado tener un papel destacado en el proceso de angiogénesis tumoral, en nuestro estudio además se perfila un papel como biomarcadores diagnósticos y pronósticos del CCR, pero estudios más amplios deben ser realizados para establecer y aceptar su uso clínico habitual.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is currently a major public health problem because of its high incidence and mortality. It is associated with a 90% survival at 5 years in early stages but 20% of patients will present metastatic disease at the time of diagnosis with a 10% survival at 5 years. Currently the prognosis and treatment are based mainly on the clinical and histopathological stage, according to the TNM system, but does not predict the individual clinical course. During the last few years, new molecular biology techniques have been developed which have shown that alterations in gene expression lead to colorectal carcinogenesis. Advances in understanding the molecular genetics of CRC are being very important in the development of a variety of biomarkers for early detection, prognosis and prediction of treatment response. Angiogenesis is the formation of new blood vessels and is essential for malignant tumor growth, progression and metastasis, therefore it has been proposed as a prognostic marker in a variety of malignant tumors and a great effort has been made to find specific markers.

In our study we performed a molecular and immunohistochemical analysis of CRC based on known angiogenesis markers (VEGF and Endoglin), evaluating its usefulness as diagnostic markers of progression and recurrence. Our sample includes 133 patients undergoing CRC (40 rectal cancer and 93 colon cancer), from which we collected three types of variables: clinical, anatomopathological and molecular. Endoglin and VEGF were analyzed as membrane proteins in tumor and non-tumor tissue of the surgical specimen by detection of RNA expression by quantitative RT-PCR and in their soluble form in preoperative plasma samples at 3, 6 and 9 months. In addition, Endoglin was observed in both tumor and non-tumor tissue by immunohistochemical staining.

In our descriptive analysis we observed a higher incidence in men than in women (63.16% vs 36.84%) and in people over 65 years compared to those under 65 years (70.67% vs 29.33%). In the colon cancer group, 60.2% of the patients were diagnosed in less aggressive stages and no correlation was found with the tumor site, unlike the rectal cancer group where only 35% were diagnosed in less aggressive stages and tumors in the middle and lower rectum accounted for 84.6% of the most aggressive stages (stage III and IV). In this location, 100% of the tumors received neoadjuvance and 74.1% adjuvant. A statistically significant relationship was observed between rectus tumors in more aggressive stages and the appearance of metastases, as well as their presence in more than one location. Regarding the global RCC

group, 12.78% presented synchronous metastases at diagnosis and a 12.72% metachronous metastasis during the follow-up period, 55.17% of all metastases were located in the liver.

In the analysis of the molecular variables we observed that the gene expression of VEGF is stronger than that of Endoglin in the tumor tissue of both types of tumors so it can be considered a good tumor marker of angiogenesis in the CRC. Regarding plasma soluble levels, VEGF tends to decrease in the less aggressive tumors in contrast to the more aggressive tumors, which could be an indicator of the evolution of patients with CRC after surgery. Regarding the expression of Endoglin observed by IHQ by specific staining, a greater expression in the vascular endothelium of the tumor tissue in more aggressive stages is observed, whereas in less aggressive stages its expression predominates in the colonic epithelium, in the membranes of the tubules. This increased expression in the vascular endothelium of aggressive tumors added to the existence of metalloproteinases (specifically MMP-14) promotes the shedding of Endoglin and results in elevated levels of plasma soluble Endoglin. Soluble Endoglin has been increased in preoperative samples from patients with metastases compared to patients without metastasis so it may be useful to monitor the first signs of metastasis.

In conclusion, both molecules have been shown to play a prominent role in the tumor angiogenesis process. In our study, a role as diagnostic biomarkers and CCR prognoses is also outlined, but more extensive studies should be carried out to establish and accept their usual clinical use.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1. Cáncer colorrectal.....	9
1.1. Epidemiología.....	9
1.2. Etiopatogenia.....	11
1.2.1. Factores de riesgo.....	11
1.2.1.1. Enfermedades intestinales y factores genéticos.....	12
1.2.1.2. Factores ambientales.....	16
1.2.2. Carcinogénesis.....	18
1.3. Screening.....	20
1.3.1. Estrategias de prevención del CCR.....	20
1.3.2. Clasificación del riesgo.....	21
1.3.3. Estrategias de cribado.....	22
1.4. Diagnóstico y estadiaje.....	23
1.4.1. Diagnóstico de certeza.....	23
1.4.2. Diagnóstico de extensión.....	24
1.4.3. Estadificación.....	25
1.5. Tratamiento.....	27
1.5.1. Cáncer de colon.....	28
1.5.1.1. Resecable sin metástasis.....	28
1.5.1.2. Resecable con metástasis.....	28
1.5.1.3. Irresecable.....	29
1.5.2. Cáncer de recto.....	29

1.5.2.1. Tumores susceptibles de extirpación local.....	29
1.5.2.2. Tumores clínicamente resecables.....	29
1.5.2.3. Tumores localmente avanzados irresecables.....	31
1.5.2.4. Enfermedad metastásica.....	31
1.6. Seguimiento.....	32
1.6.1. Vigilancia tras resección endoscópica de adenomas.....	32
1.6.2. Vigilancia del CCR.....	33
1.7. Factores pronósticos.....	34
2. Marcadores moleculares en CCR.....	36
2.1. Nuevos marcadores en CCR.....	36
2.2. Angiogénesis y marcadores.....	36
2.3. VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor).....	37
2.3.1. Aspectos generales.....	37
2.3.2. Estructura e isoformas.....	38
2.3.3. Fisiología del VEGF.....	39
2.3.4. Fisiopatología del VEGF.....	40
2.3.4.1. VEGF y enfermedades no tumorales.....	40
2.3.4.2. VEGF y cáncer.....	40
2.4. La superfamilia de TGF- β	42
2.5. ALK-1 (Activin Receptor Like Kinasa 1).....	43
2.6. Endogлина.....	44
2.6.1. Aspectos generales.....	44
2.6.2. Estructura e isoformas.....	45

2.6.3.	Funciones biológicas.....	47
2.6.4.	Patología asociada a mutación del gen de la Endoglin.....	48
2.6.5.	Endoglin y cáncer.....	48
II.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	53
1.	Justificación.....	53
2.	Hipótesis.....	54
3.	Objetivos.....	55
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
1.	Selección y descripción de los pacientes.....	59
1.1.	Criterios de inclusión.....	59
1.2.	Criterios de exclusión.....	60
2.	Variables.....	60
2.1.	Variables clínicas.....	60
2.2.	Variables anatomopatológicas.....	63
2.3.	Variables moleculares.....	64
3.	Ética y legislación.....	64
4.	Medios disponibles para la realización del estudio.....	65
5.	Desarrollo del estudio.....	66
5.1.	Primera fase.....	66
5.2.	Segunda fase.....	67
5.3.	Tercera fase.....	67

5.4.	Cronograma.....	68
6.	Información técnica.....	68
6.1.	Muestras de plasma.....	68
6.1.1.	Protocolo de análisis de Endogлина soluble.....	69
6.1.2.	Protocolo de análisis de VEGF en plasma.....	70
6.2.	Muestras histológicas.....	70
6.2.1.	Criomoldes.....	70
6.2.1.1.	Congelación de tejido fresco tumoral y no tumoral.....	70
6.2.1.2.	Extracción de RNA a partir de criomoldes (OCT).....	71
6.2.1.3.	Síntesis de DNA complementario (cDNA) por retrotranscripción (RT).....	73
6.2.1.4.	PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	74
6.2.2.	Parafinas.....	75
6.2.2.1.	Bloques de parafina a partir de tejido fresco no tumoral y tumoral (cassettes).....	75
6.2.2.2.	Detección de Endogлина en muestras fijadas en parafina usando el método ABC (inmunohistoquímica).....	76
7.	Estudio estadístico.....	77
8.	Limitaciones.....	78
IV.	RESULTADOS.....	81
1.	Grupo de pacientes con CCR.....	81
2.	Grupo de pacientes con cáncer de recto.....	83

2.1.	Análisis descriptivo de las variables clínicas y anatomopatológicas.....	83
2.2.	Análisis descriptivo de las variables moleculares.....	89
2.2.1.	Expresión de RNA de Endoglin y VEGF (criomoldes).....	89
2.2.2.	Niveles de proteína soluble de Endoglin y VEGF en plasma.....	90
2.2.3.	Tinción por inmunohistoquímica de Endoglin (parafinas).....	92
2.3.	Contraste de variables.....	98
2.3.1.	Relación entre el estadio preoperatorio (cTNM modificado) y niveles preoperatorios comparados con sujetos sanos.....	102
2.3.2.	Relación entre estadio preoperatorio (cTNM modificado) y evolución de los niveles en plasma en el tiempo.....	105
2.3.3.	Relación entre la evolución de los niveles solubles en plasma y metástasis.....	108
3.	Grupo de pacientes con cáncer de colon.....	111
3.1.	Análisis descriptivo de las variables clínicas y anatomopatológicas.....	111
3.2.	Análisis descriptivo de las variables moleculares.....	116
3.2.1.	Expresión de RNA de Endoglin y VEGF (criomoldes).....	116
3.2.2.	Niveles de proteína soluble de Endoglin y VEGF en plasma.....	117
3.2.3.	Tinción por inmunohistoquímica de Endoglin (parafinas).....	119
2.3.	Contraste de variables.....	124
3.3.1.	Expresión de RNA en tejido tumoral (criomoldes).....	126
3.3.2.	Relación entre el estadio preoperatorio (cTNM modificado) y niveles preoperatorios comparados con sujetos sanos.....	127
3.3.3.	Relación entre estadio preoperatorio (cTNM modificado) y evolución de los niveles en plasma el tiempo.....	128

3.3.4. Relación entre la evolución de los niveles solubles en plasma y metástasis.....	132
--	-----

V. DISCUSIÓN.....	137
--------------------------	------------

VI. CONCLUSIONES.....	153
------------------------------	------------

VII. BIBLIOGRAFÍA.....	157
-------------------------------	------------

VIII. ANEXOS.....	171
--------------------------	------------

1. Consentimiento informado del proyecto de investigación.....	171
2. Hoja de información para el paciente sobre el proyecto.....	172
3. Consentimiento informado del Biobanco.....	175
4. Declaración de Helsinki.....	177
5. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC)	184

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción:

Figura 1. Mortalidad en España en 2014 en ambos sexos.....	10
Figura 2. Mortalidad estimada por sexos en Estados Unidos en 2015.....	10
Figura 3. Contribución en el CCR de las causas genéticas y familiares.....	11
Figura 4. Clasificación de Haggitt.....	13
Figura 5. Riesgo acumulado de CCR.....	14
Figura 6. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas. Basado en el modelo de Fearon y Vogelstein.....	19
Figura 7. Clasificación del riesgo del CCR. (Guía de práctica clínica: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano).....	21
Figura 8. Modalidades de tratamiento de metástasis sincrónicas resecables.....	32
Figura 9. Estrategia de vigilancia en los adenomas colorrectales tras la polipectomía endoscópica.....	33
Figura 10. Recomendaciones de la guía de práctica clínica de la NCCN para el seguimiento del CCR (2016).....	34
Figura 11. Recomendaciones de la AGA para seguimiento de cáncer de recto (American Gastroenterological Association) (2016).....	34
Figura 12. Receptores de VEGF.....	39
Figura 13. Representación esquemática de la estructura de ALK1.....	43
Figura 14. Representación esquemática de las isoformas de L-/S-endoglina y sEng...46	
Figura 15. Modelo de regulación de la angiogénesis.....	47
<u>Material y métodos:</u>	
Figura 16. Cronograma del estudio de investigación organizado en tres fases.....	68

Figura 17. PCR Cuantitativa con Sybr Green de Applied.....	75
---	-----------

Resultados, grupo global:

Figura 18. Muestras obtenidas de las variables estudiadas.....	82
---	-----------

Resultados, cáncer de recto:

Figura 19. Distribución por sexo.....	83
--	-----------

Figura 20. Distribución por edad.....	83
--	-----------

Figura 21. Localización del tumor.....	83
---	-----------

Figura 22. Resultado biopsia por colonoscopia.....	83
---	-----------

Figura 23. Distribución según administración de neoadyuvancia.....	85
---	-----------

Figura 24. Distribución por intervenciones quirúrgica.....	85
---	-----------

Figura 25. Distribución de la administración de adyuvancia.....	87
--	-----------

Figura 26. Distribución de aparición de metástasis.....	88
--	-----------

Figura 27. Distribución de su localización de las metástasis.....	88
--	-----------

Figura 28. Evolución en el tiempo de los valores en plasma de Eng y VEGF.....	92
--	-----------

Figura 29. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	93
--	-----------

Figura 30. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	94
--	-----------

Figura 31. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	94
--	-----------

Figura 32. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	95
--	-----------

Figura 33. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	95
--	-----------

Figura 34. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	96
--	-----------

Figura 35. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	97
--	-----------

Figura 36. Inmunohistoquímica de Endoglina.....	97
--	-----------

Figura 37. Gráfico de porcentajes cTNM modificado versus nivel de Eng.....	103
---	------------

Figura 38. Gráfico de porcentajes cTNM modificado versus nivel de VEGF.....	104
Figura 39. Evolución de la Eng según estadio cTNM modificado.....	106
Figura 40. Evolución del VEGF según estadio cTNM modificado.....	107
Figura 41. Evolución de la Eng según la existencia de metástasis.....	109
Figura 42. Evolución del VEGF según la existencia de metástasis.....	110

Resultados, cáncer de colon:

Figura 43. Distribución por sexo.....	111
Figura 44. Distribución por edad.....	111
Figura 45. Localización del tumor.....	111
Figura 46. Resultado biopsia por colonoscopia.....	112
Figura 47. Distribución por intervenciones quirúrgicas.....	112
Figura 48. Distribución según estadios.....	113
Figura 49. Distribución según estadios.....	114
Figura 50. Distribución de aparición de metástasis.....	116
Figura 51. Distribución de la localización de las metástasis.....	116
Figura 52. Evolución en el tiempo de los valores en plasma de Eng y VEGF.....	118
Figura 53. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	119
Figura 54. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	120
Figura 55. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	120
Figura 56. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	120
Figura 57. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	121
Figura 58. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	122
Figura 59. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	122

Figura 60. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	123
Figura 61. Inmunohistoquímica de Endogлина.....	123
Figura 62. Gráfico de porcentajes cTNM versus nivel de Eng.....	127
Figura 63. Gráfico de porcentajes cTNM versus nivel de VEGF.....	128
Figura 64. Evolución de la Eng según estadio TNM modificado.....	130
Figura 65. Evolución del VEGF según estadio TNM modificado.....	131
Figura 66. Evolución de la Eng según la existencia de metástasis.....	133
Figura 67. Evolución del VEGF según la existencia de metástasis.....	134
 <u>Discusión:</u>	
Figura 68. Función de la Endogлина en el cáncer.....	148

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción:

Tabla 1. Localizaciones más frecuentes de cáncer en España en 2012.....	9
Tabla 2. Criterios de Amsterdam II y criterios de Bethesda.....	15
Tabla 3. Criterios diagnósticos de Poliposis Serrada.....	16
Tabla 4. Diagnóstico de certeza y de extensión del CCR.....	23
Tabla 5. Clasificación TMN versión 1.2016 del AJCC y la UICC (<i>corresponde con tabla 8 en la página 61</i>).....	26
Tabla 6. Correlación entre los distintos sistemas de estadificación del CCR.....	27
Tabla 7. Supervivencia por estadios a los 5 años del CCR.....	35

Material y métodos:

Tabla 8. Clasificación TMN versión 1.2016 del AJCC y la UICC (<i>corresponde con tabla 5 en la página 26</i>)	61
Tabla 9. Correlación entre los distintos sistemas de estadificación del CCR.....	62
Tabla 10. Índice de Dworak.....	63

Resultados, cáncer de recto:

Tabla 11. División por estadios según la última versión del 2016 del sistema cTNM de la AJCC y UICC.....	84
Tabla 12. División de los estadios en dos grandes grupos.....	84
Tabla 13. División por estadios según la última versión del 2016 del sistema ypTNM de la AJCC y UICC.....	86
Tabla 14. División de los estadios en dos grandes grupos.....	86
Tabla 15. Motivos por los cuales los pacientes no recibieron adyuvancia.....	87
Tabla 16. Características de la variable de seguimiento metástasis.....	88
Tabla 17. Motivo y mes de exitus de los pacientes fallecidos.....	89

Tabla 18. Resumen de los criomoldes obtenidos en cáncer de recto.....	89
Tabla 19. Análisis estadístico de los valores obtenidos en la expresión génica.....	90
Tabla 20. Valores obtenidos en plasma de Eng.....	91
Tabla 21. Valores obtenidos en plasma de VEGF.....	91
Tabla 22. Neoadyuvancia vs localización y estadio preoperatorio.....	98
Tabla 23. Estadio preoperatorio vs localización y neoadyuvancia.....	99
Tabla 24. Estadio preoperatorio vs adyuvancia y metástasis.....	100
Tabla 25. Estadio postoperatorio vs metástasis.....	101
Tabla 26. Niveles de Eng en plasma en momento 0 según cTNM modificado.....	103
Tabla 27. Niveles de VEGF en plasma en momento 0 según cTNM modificado.....	104
Tabla 28. Relación cTNM modificado con niveles de plasma en los distintos momentos.....	105
Tabla 29. Valores de Eng y VEG en plasma vs metástasis y tiempo.....	108

Resultados, cáncer de colon:

Tabla 30. División por estadios según la última versión del 2016 del sistema TNM de la AJCC y UICC.....	113
Tabla 31. División de los estadios en dos grandes grupos.....	114
Tabla 32. Motivos por los cuales los pacientes no recibieron adyuvancia.....	114
Tabla 33. Características de la variable de seguimiento metástasis.....	115
Tabla 34. Motivo y mes de exitus de los pacientes fallecidos.....	116
Tabla 35. Expresión de RNA de Eng y VEGF en los criomoldes obtenidos.....	117
Tabla 36. Valores obtenidos en plasma de Eng.....	117
Tabla 37. Valores obtenidos en plasma de VEGF.....	118
Tabla 38. Biopsia vs estadio TNM y metástasis a los 9 meses.....	124

Tabla 39. Estadío según clasificación TNM modificado vs metástasis (tiempo y localización) y adyuvancia.....	125
Tabla 40. Estadío TNM modificado vs expresión génica en tejido tumoral de VEGF..	126
Tabla 41. Estadío TNM modificado vs expresión génica en tejido tumoral de Eng....	126
Tabla 42. Niveles de Eng en plasma en momento 0 según cTNM modificado.....	127
Tabla 43. Niveles de VEGF en plasma en momento 0 según cTNM modificado.....	128
Tabla 44. Estadío según clasificación TNM modificado vs niveles de solEng y VEGF soluble en cada momento medido.....	129
Tabla 45. Niveles de Eng y VEGF vs metástasis.....	132

CLAVE DE ABREVIATURAS

AAP	Amputación abdominoperineal
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALK 1	Activin receptor-like Kinasa 1
ALK 5	Activin receptor-like Kinasa 5
APC	Adenomatous polyposis coli
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
CCHNP	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
CCR	Cáncer colorrectal
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
CMS	Cancer molecular subtype
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
CU	Colitis Ulcerosa
DNA	Deoxyribonucleic acid
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Etilendiaminotetracético
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay

EMA	Agencia Europea de Medicamentos
ENG	Endogлина
ETM	Excisión total del mesorrecto
FIT	Fecal Immnochemical Test
FOLFOX	Fluoracilo- Oxaliplatino
HHT	Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia
HIPEC	Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IHF	Inmunohistofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAV	Malformaciones arteriovenosas
MDB	Membrane Desalting Buffer
MMP-14	Matrix metalloproteinase-14
MRC	Margen de resección circunferencial
MSI	Microsatellite instability
MSS	Microsatellite stability
MVD	Microvessel density
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NRP-1	Neurolipina 1
OCT	Optimal Cutting Temperature
OMS	Organización mundial de la Salud
PAF	Poliposis adenomatosa familiar

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PET-TC	Tomografía por emisión de positrones- Tomografía computarizada
qPCR	PCR cuantitativa
QT	Quimioterapia
RAA	Resección anterior alta
RAB	Resección anterior baja
RAUB	Resección anterior ultrabaja
RGD	Arginina- Glicina- Ácido aspártico
RM	Resonancia magnética
RNA	Ribonucleic acid
RT	Radioterapia
RT	Retrotranscripción
SOHi	Sangre oculta en heces por método inmunológico
solEng	Endoglina soluble
TAC	Tomografía axial computarizada
TAMIS	Transanal minimally invasive surgery
TEM	Transanal endoscopic microsurgery
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TMB	Tetrametilbencidina
TNF-α	Tumor Necrosis Factor

UICC	Union Internacional Contra el Cáncer
UIV	Urografía intravenosa
US FDA	US Food and Drug Administration
USPSTF	US Preventive Services Task Force
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPF	Vascular Permeability Factor
vWF	Factor de von Willebrand
XELOX	Xeloda (Capecitabina)- Oxaliplatino
ZP	Zona pelúcida
5-FU	5-Fluoracilo

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER COLORRECTAL

1.1 Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) es actualmente un importante problema de salud pública por su alta incidencia y mortalidad. Según datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) a través de su agencia internacional de investigación en cáncer y el proyecto GLOBOCAN 2012 donde se estima la incidencia, prevalencia y mortalidad de los principales tipos de tumores a nivel mundial, hubo 1.4 millones de casos nuevos y 694000 muertes consecuencia del CCR (Torre LA et al., 2012).

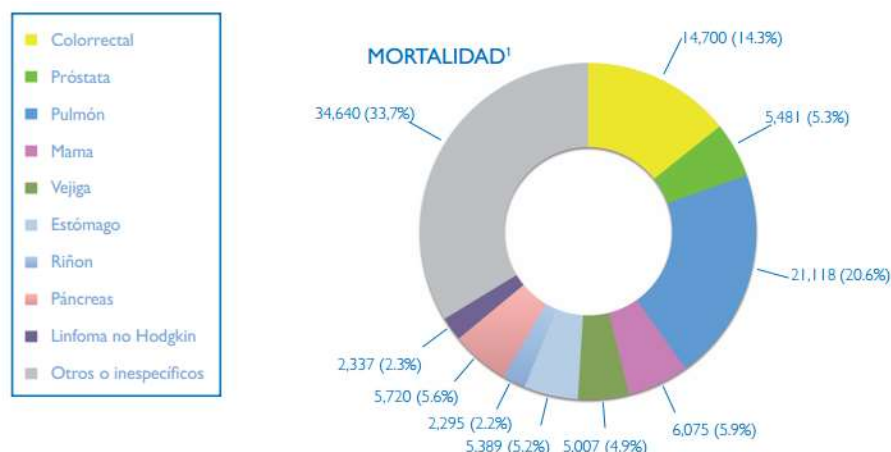
En España es la tercera neoplasia más frecuente en varones, la segunda en mujeres y la primera en ambos sexos (Tabla 1). Según datos actualizados de la *aecc* (Asociación Española contra el Cáncer), teniendo en cuenta ambos sexos aparecen en España entre 28.500 y 33.800 casos nuevos cada año.

	Hombre	Mujer	Ambos Sexos
1º	Próstata	Mama	Colorrectal
2º	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3º	Colorrectal	Cuerpo de Útero	Pulmón
4º	Vejiga	Pulmón	Mama
5º	Estómago	Ovario	Vejiga

Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

Tabla 1. Localizaciones más frecuentes de cáncer en España en 2012.

Es la segunda causa de mortalidad relacionada con el cáncer en ambos sexos tanto en España como en Estados Unidos (Figura 1 y 2). La supervivencia estimada a los 5 años en nuestro medio es del 49.5% en el cáncer de colon y del 43% en el cáncer de recto. En contraste con las tres décadas anteriores se ha visto que en muchos países las tasas de mortalidad han disminuido, probablemente relacionado con el screening del CCR, con la disminución de los factores de riesgo y por tratamientos disponibles en la actualidad (Ferlay J et al., 2014; Siegel RL et al., 2015).



¹Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

Figura 1. Mortalidad en España en 2014 en ambos sexos.

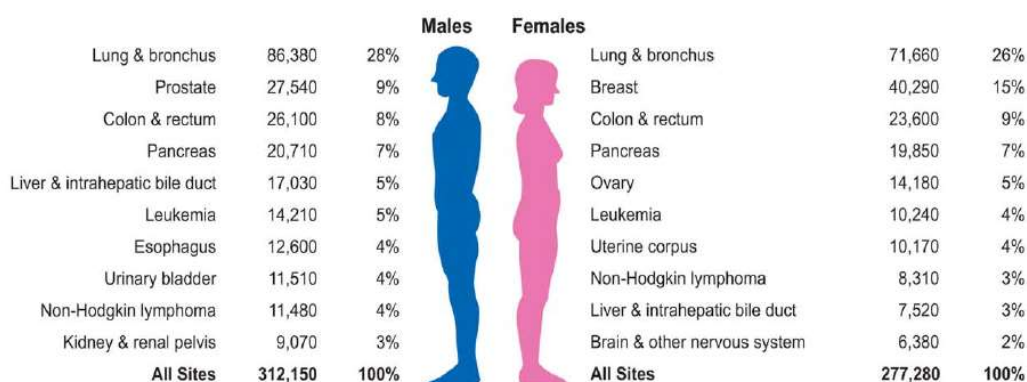


Figura 2. Mortalidad estimada por sexos en Estados Unidos en 2015.

Aparece con mayor frecuencia entre la quinta y séptima década de la vida, y en un pequeño porcentaje de casos el diagnóstico se efectúa en edades inferiores a los 40 años sobre todo en el contexto de formas hereditarias (Bessa Caserras X et al., 2011).

Las tasas más elevadas corresponden a los países industrializados (América del Norte, Europa, Australia y Nueva Zelanda), siendo significativamente más bajas en América del Sur, África y Asia. Las diferencias geográficas son atribuibles a la dieta y la exposición ambiental, impuestas sobre una base de susceptibilidad determinada genéticamente. En los países occidentales el riesgo de desarrollar un CCR a lo largo de la vida es del 5-6% (Torre LA et al., 2012).

El cáncer de colon es tres veces más frecuente que el de recto. Se ha observado un aumento gradual en la incidencia de lesiones del colon derecho, probablemente relacionado con el cambio de factores ambientales y el hecho de que la colonoscopia sea más efectiva en la prevención de lesiones del colon izquierdo (Jessup JM et al., 1996).

1.2 Etiopatogenia

1.2.1 Factores de riesgo

El CCR presenta una clara asociación con factores ambientales (dieta rica en grasas y baja en fibra, sedentarismo y obesidad), y con el envejecimiento progresivo de la población. La edad es el factor de riesgo más frecuente, la mayoría de los CCR se diagnostican después de los 60 años y sólo el 10% antes de los 40 años (Sandler RS, 1996).

Existe igualmente una fuerte asociación con factores genéticos (antecedentes familiares, síndrome de Lynch y poliposis adenomatosa familiar o PAF), responsables del 20-25% de casos, denominados familiares o de causa genética. El 75-80% de los CCR son no hereditarios y se denominan “esporádicos” (Figura 3).

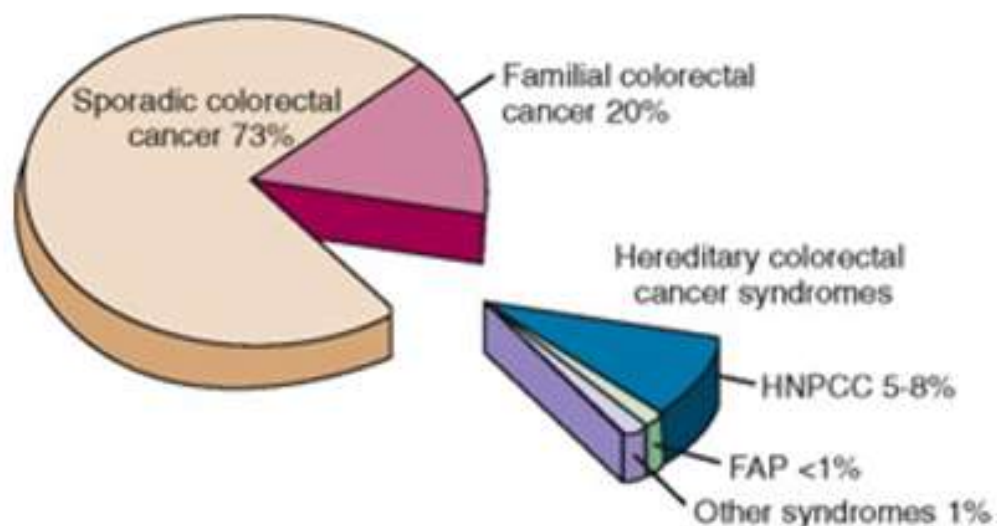


Figura 3. Contribución en el CCR de las causas genéticas y familiares. FAP, familial adenomatous polyposis; HNPCC, hereditary nonpolyposis colon cáncer.

1.2.1.1. ENFERMEDADES INTESTINALES Y FACTORES GENÉTICOS

- **Enfermedad inflamatoria intestinal (EII):**

Los pacientes con EII presentan un alto riesgo de desarrollar CCR, los factores determinantes son la extensión, la duración y la actividad de la enfermedad.

En los pacientes con Colitis Ulcerosa (CU), el riesgo de desarrollar cáncer aparece a los 8-10 años del diagnóstico inicial. Existe un mayor riesgo en los pacientes diagnosticados en edad temprana y con colangitis esclerosante primaria asociada. La cirugía profiláctica (proctocolectomía) es recomendable en pancolitis de larga evolución.

La Enfermedad de Crohn (EC) presenta un riesgo similar de CCR que la pancolitis por CU.

- **Pólipos adenomatosos de colon (adenomas):**

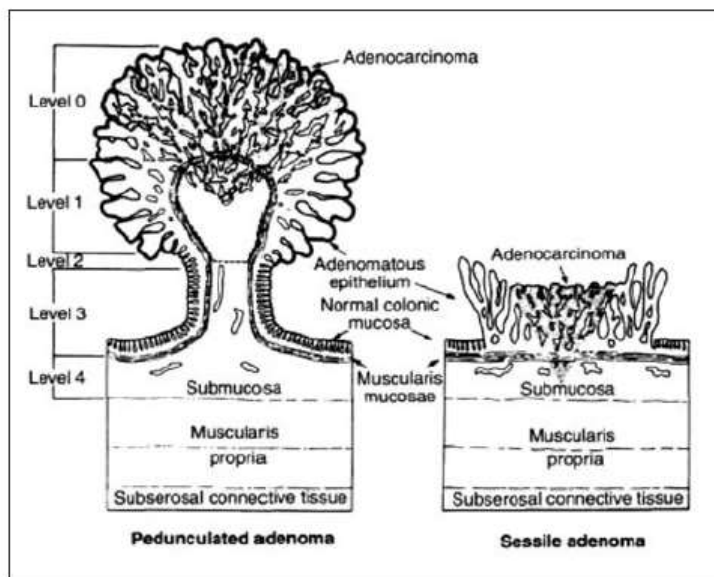
El término pólipo se define como cualquier tumor circunscrito que protruye desde la pared hacia la luz intestinal, se clasifican en neoplásicos (fundamentalmente adenomas) y no neoplásicos (hiperplásicos, inflamatorios y hamartomatosos).

La OMS clasifica los adenomas en tres tipos:

- Adenomas tubulares: son los más comunes (87%), suelen ser pedunculados y pueden ser fácilmente extirpados en una colonoscopia. Cuanto mayor sea su tamaño más probabilidades tienen de convertirse en cáncer.
- Adenomas vellosos: son los menos frecuentes (5%) y los más propensos a desarrollar cáncer. Son generalmente planos, con una base ancha lo que hace difícil su extirpación endoscópica, requiriendo en ocasiones cirugía.
- Adenomas túbulovellosos: mezcla de ambos, constituyen alrededor de un 8% del total.

Aunque su crecimiento es lento, tienen el potencial de convertirse en cáncer. Se estima que son necesarios entre 5 y 10 años para que un pólipo <1cm se convierta en cáncer invasivo (Guía de práctica clínica: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano, 2004).

Haggitt y et al. clasificaron el cáncer colorrectal temprano en lesiones de tipo pediculado y sésil, y lo estratificaron en función del grado de invasión que es el factor pronóstico más importante de los carcinomas que se desarrollan sobre pólipos adenomatosos (figura 4). Los niveles de invasión 1, 2 y 3 presentan bajo riesgo de metástasis ganglionares y pueden ser tratadas mediante resección endoscópica, a diferencia del nivel 4 que puede requerir resección quirúrgica por invasión en profundidad (Ruiz Tovar J. et al., 2010). En lesiones no pediculadas, planas o deprimidas, esta clasificación pierde valor.



Grado 0	Invasión mucosa por encima de la <i>muscularis mucosae</i> (carcinoma <i>in situ</i>)
Grado 1	Invasión de la submucosa, pero limitado a la cabeza del pólipo
Grado 2	Invasión de la submucosa del cuello
Grado 3	Invasión de la submucosa de cualquier parte del tallo
Grado 4	Invasión de la submucosa por debajo del tallo sin alcanzar la muscular propia

Figura 4. Clasificación de Haggitt.

- **Historia personal o familiar de CCR o pólipos adenomatosos:**

Los pacientes diagnosticados previamente de un CCR presentan riesgo de desarrollar enfermedad metacrónica, aproximadamente el 33% presentarán otro cáncer en los 3 años siguientes a la cirugía (Kahi Charles J. et al., 2016).

La historia familiar es un factor de riesgo importante, incluso fuera de los síndromes con una predisposición genética definida. El riesgo es dos veces mayor cuando hay un familiar de primer grado con CCR y se triplica cuando existen dos o más familiares afectados o un caso diagnosticado antes de los 50-60 años de edad (Figura 5).

Situación familiar	Riesgo acumulado de CCR
Riesgo en población general	6%
Un familiar de primer grado ^a con CCR	2-3 veces ^b
Dos familiares de primer grado con CCR	3-4 veces ^b
Un familiar de primer grado con CCR diagnosticado antes de los 50 años	3-4 veces ^b
Un familiar de segundo ^c o tercer ^d grado con CCR	~ 1,5 veces ^b
Dos familiares de segundo grado con CCR	~ 2-3 veces ^b
Un familiar de primer grado con adenoma colorrectal	~ 2 veces ^b

CCR: cáncer colorrectal.

^aFamiliares de primer grado: padres, hermanos e hijos.

^bIncremento respecto al riesgo de la población general.

^cFamiliares de segundo grado: abuelos, tíos y sobrinos.

^dFamiliares de tercer grado: bisabuelos y primos.

Figura 5. Riesgo acumulado de CCR.

▪ **Síndrome hereditario no polipósico: Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP):**

Es un síndrome que se transmite de forma autosómica dominante y es responsable del 5-6% del total de CCR. Se caracteriza por su inicio precoz, sobre todo en colon derecho, y elevada tendencia a presentar lesiones sincrónicas o metacrónicas, así como neoplasias en otros órganos (endometrio, ovario, mama, vía biliar, páncreas, estómago, intestino delgado y sistema urinario).

Desde el punto de vista molecular, el marcador genético que lo caracteriza es la inestabilidad de microsatélites (MSI, del inglés "Microsatellite instability"), caracterizada por la expansión o contracción de repeticiones cortas de secuencias de ADN causadas por inserción o supresión de unidades. Las mutaciones en los genes MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 causan el síndrome de Lynch, con una penetrancia de aproximadamente el 80% para el CRC, 60% para el endometrial, y muy por debajo del 20% para otros tipos de cánceres (De la Chapelle A., 2004).

Los criterios diagnósticos se establecieron en 1991 en una conferencia de consenso realizada en Amsterdam con el fin de identificar y clasificar a los pacientes con antecedentes familiares de CCR. Posteriormente estos criterios han evolucionado y se han creado los criterios de Bethesda que facilitan el diagnóstico de dicho síndrome (Tabla 2).

Criterios de Amsterdam II	Criterios de Bethesda revisados
Tres o más individuos con cáncer colorrectal o tumor asociado al síndrome de Lynch (endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal), uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos, y	Paciente con cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años, o
Afectación de 2 generaciones consecutivas, y	Paciente con cáncer colorrectal sincrónico o metacrónico, u otro tumor asociado al síndrome de Lynch (a), independientemente de la edad del diagnóstico, o
Como mínimo un caso diagnosticado antes de los 50 años, y	Paciente con cáncer colorrectal con histología característica de síndrome de Lynch (b), diagnosticado antes de los 60 años de edad, o
Exclusión del diagnóstico de poliposis adenomatosa familiar, y	Paciente con cáncer colorrectal y uno o más familiares de primer grado (c) con un tumor asociado al síndrome de Lynch (a), uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años, o
Confirmación de los diagnósticos con informes anatomopatológicos	Paciente con cáncer colorrectal y 2 o más familiares de primer o segundo grado (d) con un tumor asociado al síndrome de Lynch (a), independientemente de la edad

<p>(a) Incluye: cáncer colorrectal, endometrio, ovario, páncreas, uréter y pelvis renal, tracto biliar, intestino delgado, cerebral (glioblastoma), adenomas sebáceos y queratoacantomas.</p> <p>(b) Presencia de linfocitos infiltrantes del tumor, reacción de tipo Crohn, diferenciación mucinosa / anillo de sello, o crecimiento medular.</p> <p>(c) Familiares de primer grado: padres, hermanos e hijos.</p> <p>(d) Familiares de segundo grado: tíos, abuelos y sobrinos.</p>

Tabla 2. Criterios de Amsterdam II y criterios de Bethesda.

▪ **Poliposis adenomatosa familiar (PAF) y sus variantes:**

Representa menos del 1% del total de CCR y se caracteriza por la aparición de cientos a miles de pólipos adenomatosos en el colon durante la infancia. Los síntomas comienzan en la segunda década y si no se realiza una colectomía profiláctica el 90% desarrollarán cáncer entre los 40-50 años.

Es de herencia autosómica dominante con alta penetrancia, es causada por mutación en el gen APC (del inglés “adenomatous polyposis coli”), localizado en el cromosoma 5 (5q21). El 20-30% de los casos son mutaciones “de novo” sin historia familiar aparente (De la Chapelle A., 2004).

Las variantes de este síndrome comprenden el síndrome de Gardner (asocia tumores extra intestinales y otras anomalías), el síndrome de Turcot (asocia tumores cerebrales) y una variante atenuada, difícil de diferenciar del síndrome de Lynch.

▪ **Otros síndromes genéticos:**

Existen otros síndromes genéticos que asocian mayor riesgo de presentar CCR, entre ellos destaca:

- Síndrome de Peutz-Jeghers: múltiples pólipos hamartomatosos gastrointestinales asociados a melanososis mucocutánea. El 50% son causados por mutación en el gen LKB1.
- Síndrome de poliposis juvenil familiar: 50-200 pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal y otras anomalías congénitas asociadas. Causado por mutaciones de las proteínas SMAD4 y BMPR1A, que juegan un papel importante en las vías de señalización del TGF β (Transforming Growth Factor β).
- Poliposis hiperplásica: más de 20 pólipos hiperplásicos localizados en áreas del colon y el recto diferentes a la unión rectosigmoidea.
- Síndrome de poliposis serrada: según la OMS su diagnóstico se basa en uno de los tres criterios que se muestran en la tabla 3:

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE SÍNDROME DE POLIPOSIS SERRADA (OMS)
A) Al menos 5 pólipos serrados proximales a sigma, siendo 2 de ellos $\geq 10\text{mm}$
B) Cualquier número de pólipos serrados proximales a sigma si antecedentes familiares de primer grado de SPS
C) >20 pólipos serrados de cualquier tamaño distribuidos a lo largo del colon.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de Poliposis Serrada.

1.2.1.2. FACTORES AMBIENTALES

▪ **Obesidad y sedentarismo:**

La obesidad es un conocido factor de riesgo del CCR, un reciente meta-análisis ha demostrado que la ganancia de peso en la edad adulta y la edad media está asociada con un aumento de riesgo significativo (Karahalios et al., 2015).

También se ha relacionado el sedentarismo como factor de riesgo, aquellos individuos que realizan actividad física presentan un menor riesgo estadístico de presentar cáncer de colon tanto proximal como distal (Boyle et al., 2012).

- **Dieta:**

La dieta es considerada uno de los mayores factores etiológicos, sin embargo, es difícil determinar su relación con el cáncer debido a los múltiples factores de confusión creados por las interacciones entre los diferentes alimentos.

El consumo de fruta y verdura está inversamente relacionado con el CCR, especialmente el consumo de fruta y más fuerte en relación con el cáncer de recto. La fibra del cereal se cree que reduce el riesgo bien porque altera el sitio donde se produce la fermentación del almidón o bien porque cambia la absorción y el metabolismo de los carcinógenos de los alimentos, pero su aumento de ingesta no se ha relacionado con disminución del riesgo (Terry et al., 2001)

Aunque no existen datos consistentes, el consumo a largo plazo de carnes rojas o procesadas parece estar asociado con el CCR, especialmente en el colon izquierdo. Esto se debe a que las altas temperaturas con las que se cocinan producen hidrocarburos poliaromáticos y otros carcinógenos en el proceso de carbonización. La carne magra parece estar asociada con un riesgo menor.

Una ingesta elevada de grasas, especialmente saturadas, ocasiona una proliferación anormal de la mucosa cólica debido a que los ácidos biliares producen una hiperproliferación de la mucosa intestinal por activación de AP-1, un factor de transcripción asociado con la transformación neoplásica de las células cólicas (Glinghammar et al., 1999).

- **Alcohol:**

Existe una relación causal demostrada entre la ingesta elevada de alcohol y el riesgo de CCR. Comparado con no bebedores o bebedores ocasionales, los bebedores moderados (>1-4 bebidas/día, equivalente a 12.6-49.9% gr/día de etanol) tienen un 21% de riesgo asociado y los grandes bebedores (≥4 bebidas/día, ≥50 gr/día) un 52% de riesgo de CCR (Fedirko et al., 2011).

Este elevado riesgo parece estar relacionado con la interferencia en la absorción de ácido fólico por el alcohol y su consecuente disminución de los niveles.

- **Tabaco:**

Asociado fuertemente con la aparición de adenomas colorectales durante los primeros 20 años de consumo de tabaco, se podría considerar como un factor de riesgo de CCR, pero con un tiempo de latencia muy largo (Le Marchan L. et al., 1997).

1.2.2 Carcinogénesis

Abundantes datos clínico e histopatológicos sugieren que la mayoría, si no todos, los carcinomas colorrectales proceden de un tumor benigno o adenoma preexistente. La secuencia adenoma-carcinoma (proceso de cambio genético en las células epiteliales de la mucosa del colon) propuesta por Jackman & Mayo en 1951 prevalece como elemento esencial de su etiología.

El CCR, como otros tumores, surge como resultado de la acumulación de alteraciones genéticas heredadas y/o causadas por factores endógenos y/o exógenos que provocan la transformación de un epitelio normal a un adenocarcinoma invasivo. La carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos de alteraciones genéticas que se acumulan, produciendo en última estancia el fenotipo neoplásico. Actualmente el concepto de carcinogénesis colorrectal implica una cascada de errores genéticos que afectan a los siguientes genes: reparadores de ADN, supresores de tumores y proto-oncogenes.

La progresión de la carcinogénesis de colon está descrita en el modelo clásico de Fearon y Vogelstein, en la que destacan alteraciones en los genes APC, KRAS, TP53 y BRAF. Según estos autores se requieren al menos siete alteraciones para que se desarrolle un tumor maligno y dichas alteraciones genéticas acompañarían la secuencia epitelio normal, displasia, adenoma temprano, adenoma tardío, carcinoma y metástasis. (Vogelstein et al., 1990).

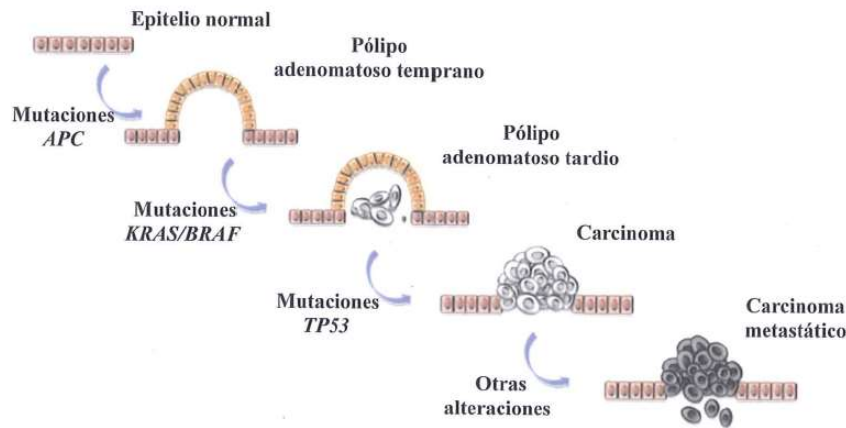


Figura 6. Progresión del cáncer colorrectal y acumulación de alteraciones genéticas. Basado en el modelo de Fearon y Vogelstein (Vogelstein et al., 1988)

El CCR se ha clasificado por sus características clínicopatológicas, sin embargo, tumores con características histológicas y estadios tumorales similares, pueden presentar resultados clínicos y respuesta al tratamiento heterogéneo. Estas diferencias pueden explicarse por los eventos moleculares iniciadores, tales como la inestabilidad de microsatélites (MSI) o las mutaciones en RAS y BRAF, sin embargo, estos biomarcadores no han resultado útiles para individualizar el tratamiento.

Existen varias clasificaciones moleculares basadas en el perfil de expresión génica del tumor, sin embargo, hay diferencias entre ellas, probablemente debido a diferencias metodológicas en el procesamiento de las muestras, en el análisis de la expresión de los genes, así como en el número y las características de los pacientes incluidos.

Una de las clasificaciones más recientes es la descrita por Sadanandam et al. en 2014, en la cual se analizaron 4000 muestras de CCR (principalmente estadios II-III). Se identificaron cuatro subtipos moleculares que clasificaron correctamente el 78% de las muestras. Hubo un quinto subgrupo sin asignación clara, y un 13% de las muestras mostró características compatibles con dos subgrupos.

- CMS1: son tumores con MSI/CIMP (inestabilidad de microsatélites/fenotipo CpG metilador) y frecuentemente presentan mutaciones en BRAF. Suelen localizarse en el colon derecho y asociarse a buen pronóstico.

- CMS2: son tumores que presentan MSS (estabilidad de microsatélites), pero también CIN (inestabilidad cromosómica, del inglés “Chromosomal instability”), sobreexpresión de EGFR y TP53 mutado. Suelen localizarse en colon izquierdo y recto.
- CMS3: tienen CIN bajo y una mayor prevalencia de CIMP, sobreexpresión de IGBP2 y mutación de KRAS y PI3K. No muestra preferencia de localización.
- CMS4: presenta activación de TGF- β y evidencia de rutas activas como la angiogénesis, la remodelación de la matriz y la inflamación mediada por el complemento. No tiene preferencia de ubicación, tiende a ocurrir en fases tardías de la enfermedad (III y IV) y se asocia a un mal pronóstico.

Los subtipos moleculares de CCR deben considerarse entidades distintas con diferentes comportamientos biológicos y respuesta al tratamiento. Para avanzar en la caracterización y uso del fenotipo del CCR en la práctica clínica, éste debe ser claramente definido (Rodríguez-Salas N. et al., 2017; De Rosa, M. et al., 2015).

1.3 Screening

1.3.1 Estrategias de prevención del CCR

- Prevención primaria: cuyo objetivo es disminuir el riesgo de desarrollar CCR y se basa principalmente en modificaciones de la dieta y el estilo de vida.
- Prevención secundaria o screening: dado que está aceptado ampliamente que los adenomas y los pólipos serrados son los precursores de la gran mayoría de CCR, su detección temprana y eliminación se asocia con una importante reducción de la incidencia y consecuentemente de la mortalidad. Además, los cánceres detectados por screening suelen ser diagnosticados en estadios tempranos y pueden ser tratados definitivamente por endoscopia o cirugía.
- Prevención terciaria o vigilancia: basada en la endoscopia de seguimiento tras resección de CCR o adenomas, minimizando el impacto de neoplasias ya establecidos (Castells A. et al., 2009).

1.3.2 Clasificación del riesgo

Los individuos menores de 50 años sin factores de riesgo adicionales no se consideran tributarios a un programa de cribado por el bajo riesgo que tienen de presentar un CCR.

Aquellos individuos con factores de riesgo personales y/o familiares se consideran que tienen un riesgo elevado de CCR por lo que cuentan con programas de vigilancia específicos. De igual manera, aquellos pacientes con síntomas o signos de presentar un CCR no son tributarios de un programa de cribado, sino que se realiza una exploración diagnóstica adecuada.

La población de riesgo medio incluye individuos ≥ 50 años sin factores de riesgo adicionales, es la que va a favorecerse del cribado poblacional sistemático o screening.

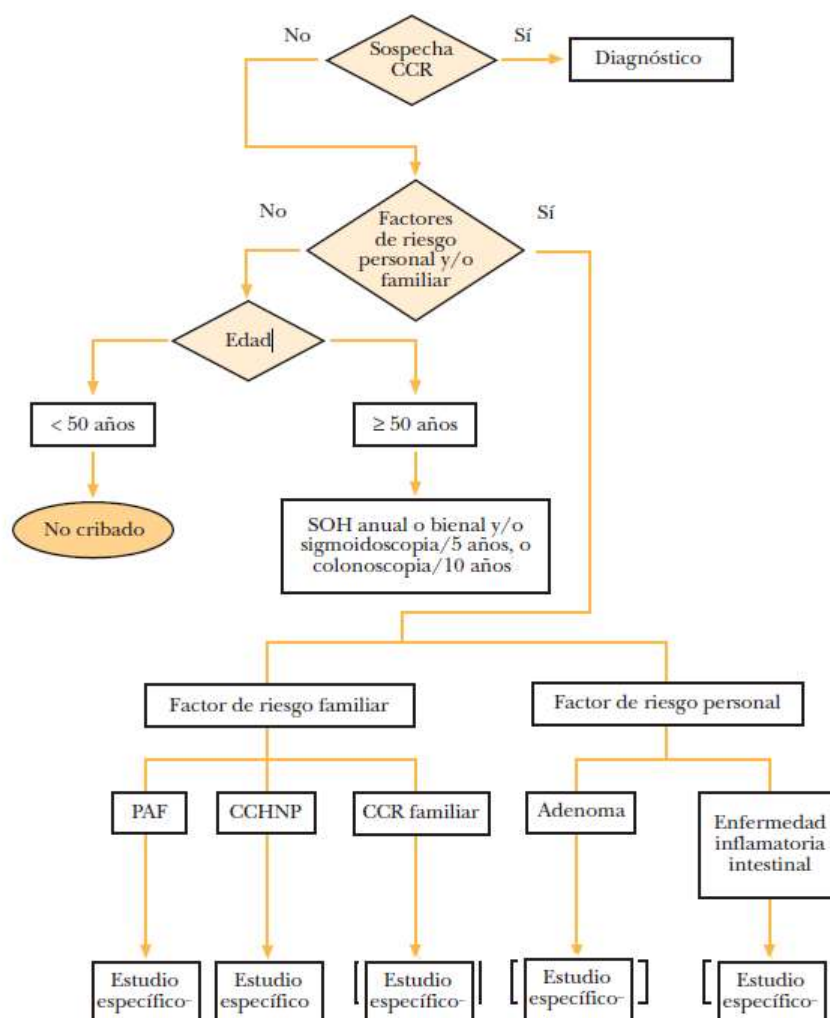


Figura 7. Clasificación del riesgo del CCR. (Guía de práctica clínica: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano).

1.3.3 Estrategias de cribado:

Existen dos formas de realizar pruebas de cribado en el CCR, directa e indirecta. La detección directa se realiza mediante pruebas endoscópicas (rectosigmoidoscopia o colonoscopia), la indirecta mediante determinación de hemoglobina en las heces. En este último caso se puede detectar hemoglobina mediante el test de guayaco (identifica el grupo heme) o por método inmunológico que identifica globina humana.

Existen distintos programas de cribado, pero no está demostrado que una estrategia sea superior a otra en estudios comparativos. La USPSTF (US Preventive Services Task Force) en sus últimas recomendaciones del 2016 para prevención del CCR, recomiendan que los médicos deben ser los que escojan la estrategia que consiga una mayor involucración de los pacientes y adhesión a lo largo del tiempo teniendo en cuenta las preferencias y disponibilidad local.

Las estrategias de cribado que proponen este grupo de trabajo son:

- Detección anual de sangre en heces mediante pruebas inmunoquímicas (SOHi o FIT, fecal immunochemical test).
- Sigmoidoscopia flexible cada 10 años y SOHi anual.
- Colonoscopia cada 10 años.
- Colonografía TAC cada 5 años.

En la actualidad el test de SOH por método inmunológico (SOHi) es el recomendado por la Guía Europea de cribado en cáncer de colon y por la mayoría de los programas de cribado a nivel mundial, al demostrar una mayor sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y facilidad de manejo que el test del guayaco clásico.

Actualmente existe en la Comunidad de Madrid el programa PREVECOLON, dirigido a todos los hombres y mujeres comprendidos entre los 50 y 69 años. El programa consiste en la realización bienal de SOHi como prueba de cribado, con un punto de corte definido en ≥ 100 ng/ml. Posteriormente, en aquellos pacientes en los que haya dado positivo, se realizará una prueba diagnóstica. La prueba de elección es la colonoscopia salvo en caso de contraindicación para su realización o imposibilidad de realizar colonoscopia completa que se valorará realizar colonografía por TAC.

1.4 Diagnóstico y estadificación

El CCR puede ser sospechado ante un paciente sintomático o puede ser un hallazgo en un paciente asintomático en una colonoscopia de control. El estudio del CCR tiene como objetivos establecer el diagnóstico de certeza y de extensión tumoral para poder realizar una estadificación correcta.

DIAGNÓSTICO DE CERTEZA	DIAGNÓSTICO DE EXTENSIÓN
Historia clínica y examen físico	Marcadores tumorales
Análisis de sangre	TAC toraco-abdomino-pélvico
Colonoscopia y biopsia	RM hepática
Enema opaco	PET-TC
Colonoscopia virtual	RM pelvis (cáncer de recto)
	Ecografía endoanal (cáncer de recto)
	Cistoscopia/UIV opcional (cáncer de recto)

Tabla 4. Diagnóstico de certeza y de extensión del CCR.

1.4.1 Diagnóstico de certeza

Historia clínica y examen físico: obligatorio para identificar factores de riesgo (antecedentes familiares de pólipos o cáncer, enfermedades sistémicas, función esfinteriana...), que influyen en la selección del tratamiento.

Análisis de sangre: Hemograma, bioquímica renal y hepática, LDH, albúmina.

Colonoscopia y biopsia: es la prueba más exacta, permite extirpación de pólipos y toma de biopsias de lesiones tumorales además de detectar lesiones sincrónicas. La biopsia del tumor debe informar sobre si se trata o no de un tumor maligno. En manos experimentadas la probabilidad de que no se detecte un pólipo es del 2-6%, mayor en el colon derecho. (Bressler et al., 2007)

Enema opaco: permite descartar lesiones sincrónicas. La incidencia de cáncer y pólipos síncronos en paciente con CCR es del 2-8% y 12-62% respectivamente.

Colonoscopia virtual o TC colonografía: indicada en pacientes con colonoscopia incompleta por razones técnicas (mala preparación u obstrucción cólica) o intolerancia a la exploración. Su sensibilidad es similar a la colonoscopia convencional siendo una alternativa menos invasiva pero dada su limitación de no poder tomar biopsias se sigue considerando a la colonoscopia convencional como el gold-standard (Atkin W. et al., 2013).

1.4.2 Diagnóstico de extensión

Marcadores tumorales: ningún marcador ha demostrado ser útil para detectar CCR primario debido a su solapamiento con enfermedades benignas y su poca sensibilidad en estadios precoces. El CEA (antígeno carcinoembrionario) sirve como indicador pronóstico y para el seguimiento posoperatorio, un CEA elevado (>50 ng/ml.) sugiere metástasis a distancia inclusive con técnicas de imagen negativas. Un meta-análisis concluyó que el CEA para el diagnóstico de CCR tiene una sensibilidad y especificidad limitada del 46 % y el 89% respectivamente. Ningún otro marcador tumoral convencional tuvo una mayor sensibilidad diagnóstica, incluyendo el CA 19.9 (Liu Z. et al., 2014).

Las directrices de la ASCO (American Society of Clinical Oncology) recomiendan que los niveles séricos de CEA se obtengan preoperatoriamente en los pacientes con CCR para ayudar en la planificación del tratamiento quirúrgico, el seguimiento posterior al tratamiento y en la evaluación del pronóstico. Los pacientes con CEA preoperatorio > 5 ng/mL tienen un peor pronóstico que aquellos con niveles más bajos. Los niveles elevados de CEA preoperatorios que no se normalizan después de la resección quirúrgica o que aumentan implican la presencia de enfermedad persistente y la necesidad de una evaluación adicional (Locker GY. et al., 2006).

TC abdominopélvico y torácico: presenta una sensibilidad mayor para detectar metástasis a distancia (75-87%) que para la detección de afectación ganglionar regional (45-73%) o profundidad de invasión transmural (aproximadamente el 50%). Además, identifica posibles complicaciones tumorales (perforación, obstrucción o fístulas).

En lesiones hepáticas dudosas se realizará ecografía abdominal y/o RM hepática. Respecto al TC de tórax, el hallazgo más frecuente son lesiones indeterminadas (10-30%), lo que aumenta la complejidad clínica, pero rara vez son malignas (7-20%) (Macrae FA. et al., 2017)

RM hepática: evalúa las lesiones hepáticas como complemento al TC.

PET-TC: no se recomienda su uso rutinario para la estadificación. Es útil ante la sospecha de enfermedad diseminada en otras pruebas de imagen.

RM pelvis: la estadificación locorregional en los cánceres de recto tiene gran importancia para la toma de decisiones terapéuticas por lo que se solicita de forma rutinaria.

Ecografía endoanal: se solicita en los casos de cáncer de recto porque aporta datos sobre la penetración mural (sensibilidad de 76-98%), la indemnidad o no del aparato esfinteriano, la posibilidad de afectación vaginal o prostática y orientan sobre el estado ganglionar mesorrectal.

Cistoscopia: está indicada para valorar la posible afectación del trigono en casos de sospecha de invasión vesical por TC o por la presencia de síntomas genitourinarios. La UIV solo será rutinaria en casos de cirugía pélvica previa.

1.4.3 Estadificación

Existen diversas clasificaciones en cuanto al estadiaje de la enfermedad. La clasificación original de Dukes de 1932, modificada por Astler & Coller en 1950 está en desuso, aunque fue extensamente utilizada por su sencillez y correlación con el pronóstico.

Actualmente el sistema de estadificación convencional es el sistema TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC) y de la Unión Internacional contra el cáncer (UICC) actualizada su última versión en el 2016 (Tabla 5 y 6).

Este sistema valora el tumor primario (T), el compromiso ganglionar (N) y la existencia de metástasis a distancia (M). El prefijo “c” indica la estadificación clínica, la “u” la estadificación por ecografía endoanal en el cáncer de recto, la “p” la estadificación anatomopatológica y la letra “y” la estadificación del tumor tras tratamiento neoadyuvante (Edge SB et al., 2010).

TUMOR PRIMARIO (T)	
Tx	El tumor primario no se puede evaluar
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de lámina propia
T1	Invade submucosa
T2	Invade muscular propia
T3	Invade los tejidos pericororrectales a través de la muscularis propia
T4a	Penetra la superficie del peritoneo visceral
T4b	Invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)	
NX	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
N1a	Metástasis en uno de los ganglios linfáticos regionales
N1b	Metástasis en 2-3 de los ganglios linfáticos regionales
N1c	Depósito de tumor en subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales sin metástasis en los ganglios linfáticos
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis confinada a un órgano o lugar (hígado, pulmón, ovario, etc)
M1b	Metástasis en más de un órgano o en el peritoneo

Tabla 5. Clasificación TMN versión 1.2016 del AJCC (American Joint Committee on Cancer) y la UICC (Unión Internacional contra el cáncer)

ESTADIO	TNM	DUKES MODIFICADA
Estadio 0	Tis N0 M0	A "in situ"
Estadio I	T1-2 N0	A Tumor limitado a mucosa B1 No atraviesa pared, ganglios negativos
Estadio IIA	T3 N0 M0	B2 No se extiende macroscópicamente más allá de la pared intestinal, ganglios negativos
Estadio IIB	T4a N0 M0	B3 Se extiende macroscópicamente más allá de la pared intestinal, ganglios negativos
Estadio IIC	T4b N0 M0	
Estadio IIIA	T1-2 N1/N1c	C1 No atraviesa pared, ganglios positivos
Estadio IIIB	T1 N2a	C2 Estadio B2 + ganglios positivos
	T3-4 N1/N1c	
Estadio IIIC	T2-3 N2a	C3 Estadio B3 + ganglios positivos
	T1-2 N2b	
	T1-4 N2b	
	T3-4a N2b	
Estadio IVA	Tx Nx M1a	D Enfermedad metastásica a distancia
Estadio IVB	Tx Nx M1b	

Tabla 6. Correlación entre los distintos sistemas de estadificación del CCR.

1.5 Tratamiento

El 70% de los pacientes diagnosticados de CCR no presentan enfermedad a distancia y la cirugía es el pilar del tratamiento curativo, si bien existe un 50% de recurrencia local. El 50-60% de los pacientes diagnosticados de CCR desarrollan enfermedad a distancia. Las metástasis metacrónicas, después del tratamiento locoregional del CCR son las más frecuentes, siendo el hígado la localización más común. Sin embargo, un 25% aproximadamente presentan metástasis sincrónicas en el momento del diagnóstico.

El tratamiento varía en función de las características del tumor, principalmente depende de su localización y de su estadio TNM.

1.5.1 Cáncer de colon

1.5.1.1. RESECABLE SIN METÁSTASIS:

El tratamiento curativo se basa en la **cirugía** mediante una colectomía según la localización del tumor y retirada en bloque de los ganglios linfáticos regionales. Si el tumor es resecable, pero está causando obstrucción, cualquiera de estas opciones es válida: 1) colectomía más resección en bloque de ganglios linfáticos; 2) resección con ostomía; 3) ostomía; 4) stent (reservado para tumores localizados distalmente cuya descompresión permite una cirugía electiva posteriormente).

La **quimioterapia adyuvante** se recomienda en el estadio III y estadio II de alto riesgo (incluyendo T4, histología pobremente diferenciada, invasión linfovascular o perineural, obstrucción, perforación, márgenes positivos o ganglios analizados insuficientes <12). Las opciones de tratamiento son XELOX (Oxaliplatino-Capecitabina), FOLFOX (Oxaliplatino + 5FU) o Capecitabina en monoterapia si no pueden recibir QT de combinación. El inicio del tratamiento adyuvante debe ser precoz después de la cirugía porque el retraso en su administración disminuye la supervivencia y debe tener una duración de 6 meses.

En las últimas recomendaciones de la NCCN del 2016, incluyen la opción de **tratamiento neoadyuvante** en tumores T4b porque se obtiene una significativa disminución del estadiaje comparado con el tratamiento posoperatorio.

1.5.1.2. RESECABLE CON METÁSTASIS

- **Sincrónicas:**

Si se trata de metástasis hepáticas o pulmonares resecables se recomienda una de las siguientes opciones: 1) cirugía conjunta o en dos tiempos seguida de QT adyuvante; 2) QT neoadyuvante 2-3 meses seguido de cirugía conjunta o en dos tiempos; 3) colectomía seguida de QT y posterior cirugía de las metástasis. La QT en cualquiera de sus modalidades no puede exceder de los 6 meses y se valorará añadir al esquema habitual (XELOX o FOLFOX) un agente biológico (Bevacizumab, Panitumumab o Cetuximab).

Si las metástasis resultan irresecables se debe iniciar QT y reevaluar cada 2 meses su resecabilidad mientras dure el tratamiento. No se recomienda la resección paliativa del tumor primario salvo riesgo de obstrucción o hemorragia.

En los pacientes que presentan carcinomatosis peritoneal, tanto en cáncer de colon como en cáncer de recto, y bien al momento del diagnóstico como posteriormente, se considerará la posibilidad de rescate quirúrgico mediante citorreducción y QT intraperitoneal hipertérmica (HIPEC, “hyperthermic intraperitoneal chemotherapy”) tras QT de inducción con respuesta favorable.

- **Metacrónicas:**

Si son resecables el tratamiento es su resección con 6 meses de QT perioperatoria, basándose en los regímenes administrados previos si los ha habido.

Si son irresecables se administrará QT paliativa con controles por TC/RM cada 2-3 meses.

1.5.1.3. IRRESECABLE:

Si el tumor primario es irresecable o el paciente inoperable se valorará la administración de QT y/o RT como primera línea de tratamiento. Si es sintomático se valorará cirugía paliativa.

1.5.2 Cáncer de recto

1.5.2.1. TUMORES SUSCEPTIBLES DE EXTIRPACIÓN LOCAL:

En tumores en estadio T1N0M0 y casos muy seleccionados de uT2N0M0, pequeños (<3 cm), que afecten menos del 30% de la circunferencia y estén situados preferiblemente lateralmente o posteriormente y dentro de 8 cm desde el borde anal se puede realizar una resección transanal. Con la técnica de TEM (Microcirugía Endoscópica Transanal) tumores situados a más de 8 cm desde el borde anal pueden ser resecado con éxito.

El paciente debe estar informado de que existe una alternativa que es la cirugía radical y que con la extirpación local existe un riesgo de recidiva local. Si el examen anatomopatológico de la pieza es desfavorable se recomienda la cirugía radical.

1.5.2.2. TUMORES CLÍNICAMENTE RESECABLES:

- **Resección radical:**

Indicada en tumores en estadio II y III, se pueden realizar varias técnicas quirúrgicas: resección anterior baja/ultra baja, amputación abdominoperineal y operación de Hartmann. Todas ellas deben perseguir una excisión total del mesorrecto (ETM) satisfactoria y un margen de 1 cm en los tumores más distales. En los tumores de tercio superior es suficiente con extirpar una porción del mesorrecto y 5 cm inferior al límite distal.

- **Tratamiento neoadyuvante:**

Estudios que comparan la RT preoperatoria con la posoperatoria concluyen que la primera presenta menor tasa de recaídas locales, toxicidad aguda y crónica y mayor tasa de preservación de esfínteres. Este efecto es independiente del fraccionamiento utilizado para administrar la dosis (ciclo corto, 25 Gy en 5 o ciclo largo 50,4 Gy a 1,8 Gy/fracción/ día), siempre y cuando se administren dosis radiobiológicas equivalentes.

El esquema general consiste en RT pélvica con QT (Capecitabina oral) con carácter radiosensibilizante. La intervención quirúrgica se realizará concluida la segunda semana después de la última sesión si ha recibido RT de ciclo corto y a la 6ª-10ª semana de la última sesión de RT si ha recibido RT de ciclo largo, según dosis administradas y tolerancia del paciente.

Sus principales indicaciones son: 1) por localización se incluyen todos los cánceres desde el promontorio hasta el ano (por debajo de la reflexión peritoneal) con criterio de resecabilidad; 2) tumores de riesgo intermedio (cT3 b, c con margen de resección circunferencial (MRC) libre, T4a con afectación peritoneal circunscrita y N+); 3) tumores localmente avanzados (cT3 b con MRC amenazado o positivo y cT4 b con infiltración de órganos adyacentes).

- **Tratamiento adyuvante:**

Con la generalización del tratamiento neoadyuvante y la ETM se ha conseguido disminuir radicalmente las recidivas locales y actualmente el principal problema son las recidivas a distancia por lo cual se recomienda QT adyuvante tras la cirugía. La NCCN recomienda los esquemas de FOLFOX, XELOX o Capecitabina en monoterapia, debe iniciarse dentro de las 8 semanas siguientes a la cirugía y tener una duración de 4-6 semanas según haya recibido neoadyuvancia o no respectivamente.

Se recomienda administrar en las siguientes situaciones: 1) pacientes infra estadificados en los que hay que corregir el estadiaje a la vista de los hallazgos patológicos; 2) pacientes que no recibieron neoadyuvancia (p. ej. cirugía de urgencias) y el tumor presenta características de mal pronóstico (pT3 N1-2, pT4 N0-2, perforación, márgenes positivos...); 3) tumores tratados con extirpación local que presentan factores de mal pronóstico y rechazan una cirugía radical; 4) pacientes que recibieron neoadyuvancia. La excepción a esta última situación serían los pacientes con cáncer de recto pT3N0 de recto medio y superior en los que se realizó una cirugía con ETM con unos márgenes radiales adecuados y se extirparon un mínimo de 12 ganglios ya que poseen un excelente pronóstico.

1.5.2.3. TUMORES LOCALMENTE AVANZADOS IRRESECABLES:

El tratamiento se basa en quimiorradioterapia preoperatoria, RT de ciclo largo concomitante con 5-FU, seguido de cirugía radical pasadas 6-8 semanas.

1.5.2.4. ENFERMEDAD METASTÁSICA:

En caso de irresecabilidad o factores pronósticos adversos se administrará QT paliativa usando los esquemas habituales y valorando la adición de agentes biológicos. Existen varias líneas de tratamiento para aquellos pacientes que no obtengan respuesta.

En caso de metástasis resecables se recomienda seguir una de las opciones mostradas en la figura 8.

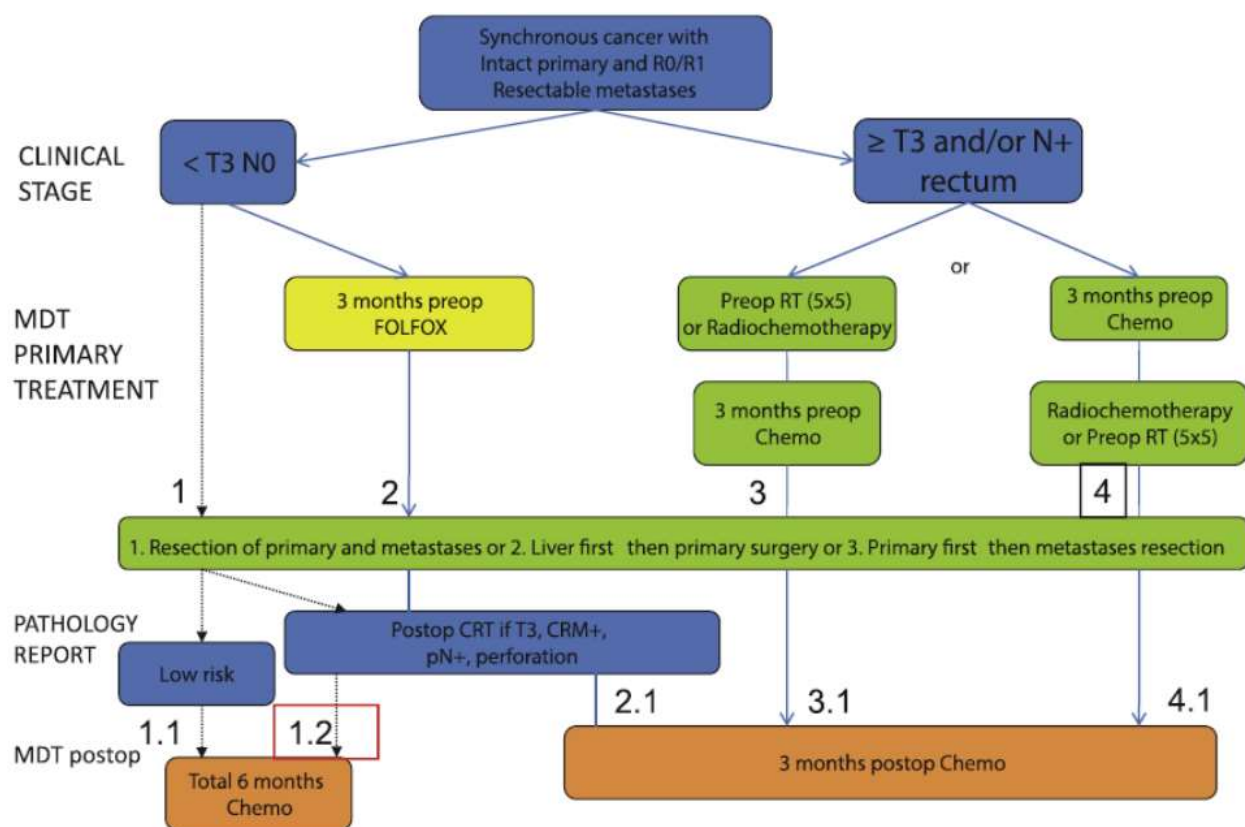
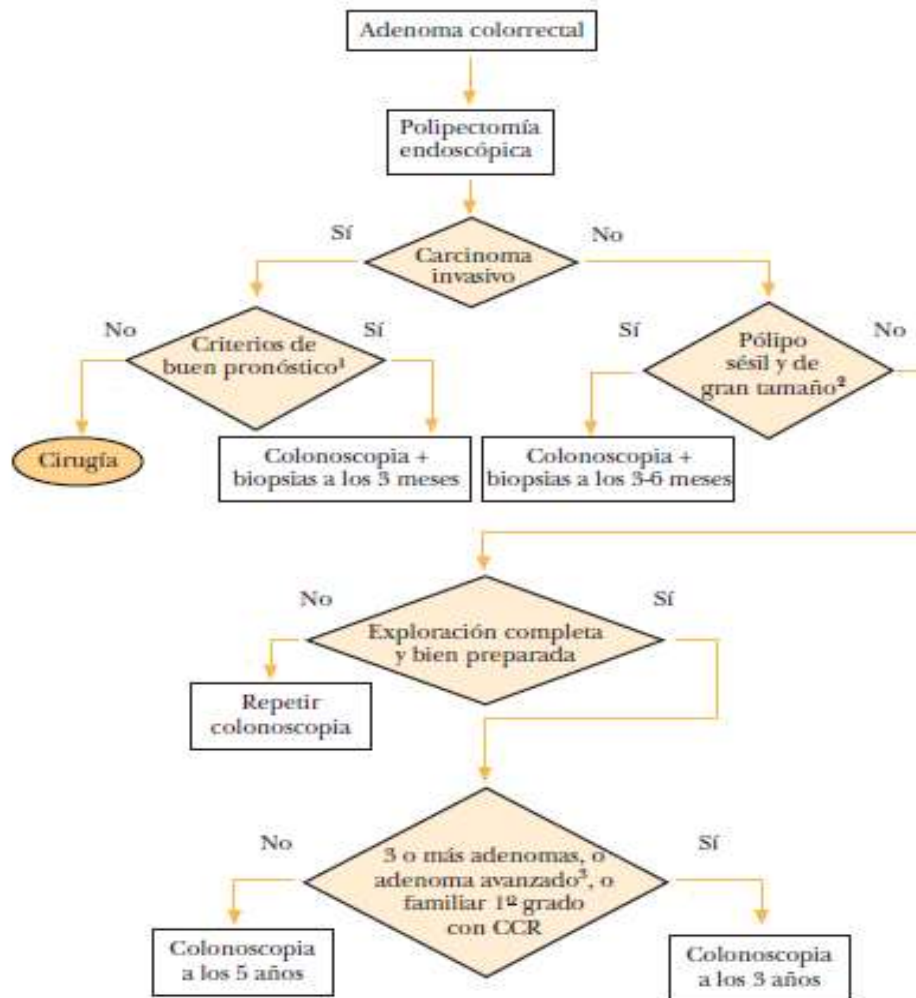


Figura 8. Modalidades de tratamiento de metástasis sincrónicas resecables.

1.6 Seguimiento

1.6.1 Vigilancia tras resección endoscópica de adenomas

La vigilancia postpolipectomía se realiza mediante colonoscopia y persigue detectar lesiones sincrónicas que pasaron desapercibidas y lesiones metacrónicas. Se ha estimado según estudios de cohortes que un 30-40% de los pacientes con adenomas colorrectales presentan neoplasias metacrónicas. En la figura 9 se presenta el algoritmo de vigilancia recomendado por las guías de práctica clínica (Guía de práctica clínica: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano).



1. Criterios de buen pronóstico: margen de resección libre, carcinoma bien o moderadamente diferenciado y ausencia de invasión linfática y vascular.

2. Fundamentalmente aquellos que requieren una resección fragmentada.

3. Adenomas avanzado: ≥ 10 mm, con componente vellosa, o con displasia de alto grado.

Figura 9. Estrategia de vigilancia en los adenomas colorrectales tras la polipectomía endoscópica. (Guía de práctica clínica: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano).

1.6.2 Vigilancia del CCR

El seguimiento de los pacientes con CCR ya tratados, está destinado a prolongar la supervivencia mediante el diagnóstico de cáncer recurrente o metacrónico en estadio precoz. Excluyendo los pacientes con cáncer de causa genética o familiar se ha visto que la tasa de cáncer metacrónico en 3 años después de la cirugía es del 33% (Kahi Charles J. et al).

La estrategia a seguir según las últimas recomendaciones del 2016 de la NCCN y la USPSTF (US Preventive Services Task Force), se resumen en las figuras 10 y 11.

Historia clínica y exploración física	Cada 3-6 meses los 2 primeros años y cada 6 meses durante los 3 años siguientes.
CEA	Cada 3 meses durante los 2 primeros años, y cada 6 meses durante los 3 años siguientes
TC tóraco-abdominal-PÉLVICO	Anual (posible cada 6 meses durante los 2 primeros años) durante 5 años. En ca colon, posible sustituir por eco abdominal.



Figura 10. Recomendaciones de la guía de práctica clínica de la NCCN para el seguimiento del CCR (2016).

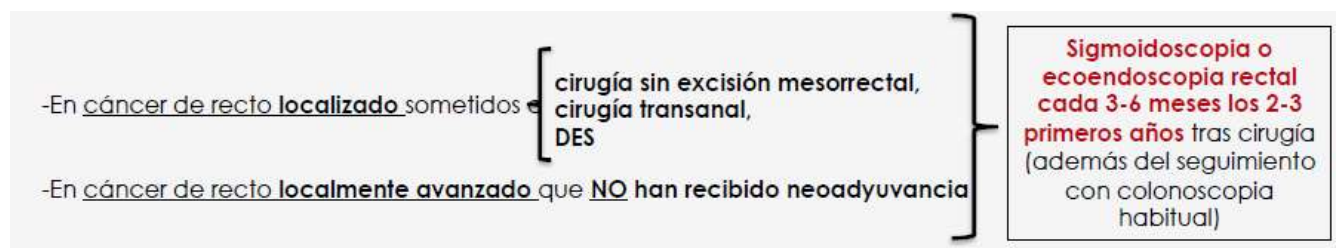


Figura 11. Recomendaciones de la AGA para seguimiento de cáncer de recto (American Gastroenterological Association) (2016)

1.7 Factores pronósticos

Estadio: Es el principal factor pronóstico y depende del tamaño del tumor, de la presencia de metástasis ganglionares y en otros órganos. La supervivencia global a los 5 años para cada uno de los estadios clínicos del CCR, si bien el cáncer de colon tiene un mejor pronóstico que el cáncer de recto, se expone en la siguiente tabla 7.

ESTADIO	SUPERVIVENCIA A LOS 5 AÑOS
Estadio I	70 a 85%
Estadio II	60 a 75%
Estadio III	40 a 60%
Estadio IV	Menos del 20%

Tabla 7. Supervivencia por estadios a los 5 años del CCR.

Edad, estado general y comorbilidades del paciente.

Obstrucción intestinal o perforación: La presentación inicial con uno de estos síntomas es un factor pronóstico negativo en la supervivencia.

Factores histopatológicos: Tamaño del tumor, tipo histológico, grado de diferenciación, presencia de células en anillo de sello, invasión linfovascular o perineural son factores que influyen en el pronóstico.

Antígeno carcinoembrionario (CEA): A pesar de ser un marcador poco específico, su valor preoperatorio está indicado como factor pronóstico. Su seguimiento posoperatorio nos indica un mal pronóstico si no se normalizan las cifras pasadas 4-6 semanas tras la cirugía o bien si se produce un aumento del mismo durante el seguimiento.

Inestabilidad de microsatélites (MSI): Los microsatélites son secciones repetidas de ADN, cuando hay inestabilidad el número normal de secciones de repetición cambia. Esto sucede por mutaciones en los genes que normalmente reparan los errores durante la replicación del ADN. Entre los pacientes con CCR localizado, los tumores que son MSI-High (MSI-H) se asocian con mayor supervivencia que los tumores MSI-low (MSI-L) o microsatélite estable (MSS), la influencia pronóstica es menos clara en los pacientes con CCR metastásico, población en la que la prevalencia de la enfermedad MSI-H es baja (aproximadamente 3,5%). Las bases biológicas de este hallazgo siguen sin estar bien definidas (A. Bolocan et al., 2012).

Márgenes quirúrgicos: Al resear un tumor se debe extirpar un margen de tejido sano alrededor del mismo, los márgenes libres de afectación tumoral tienen un mejor pronóstico que aquellos con márgenes afectados.

2 MARCADORES MOLECULARES EN CCR

2.1 Nuevos marcadores en CCR

Durante los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de biología molecular que han permitido ampliar el conocimiento sobre el ciclo celular, las proteínas involucradas y sus interrelaciones. Basándose en estos estudios moleculares se ha demostrado que alteraciones en la expresión génica conducen a la carcinogénesis colorrectal. Estas alteraciones incluyen la pérdida del equilibrio que define el balance entre la activación de genes promotores del ciclo (oncogenes), y la inactivación de genes supresores (González-Pons et al., 2015; Hanahan et Weinbert, 2000).

Al menos cuatro tipos de inestabilidad genética se han descrito en el CCR (Grady et Pritchard, 2014):

- Inestabilidad cromosómica (CIN)
- Inestabilidad de microsatélites (MSI)
- Metilación de islotes CpG (CIMP, del inglés “CpG Island Methylator Phenotype”)
- Hipometilación del ADN

Los avances en la comprensión de la genética molecular del CCR están siendo muy importantes en el desarrollo de una variedad de biomarcadores de detección temprana, pronóstico y predicción a la respuesta del tratamiento. Ejemplo de ello es el nuevo tratamiento con anticuerpos monoclonales (Cetuximab y Panitumumab), dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

2.2 Angiogénesis y marcadores

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos y es esencial para el crecimiento tumoral maligno, progresión y metástasis. Permite el crecimiento tumoral porque aporta nutrientes, oxígeno y liberación de factores de crecimiento que promueven la proliferación de células tumorales. También contribuye al proceso metastásico porque permeabiliza los nuevos vasos sanguíneos al proporcionar un gran número de fugas en la membrana basal del endotelio (Folkman J., 1990).

Se ha propuesto la angiogénesis como un marcador pronóstico en una variedad de tumores malignos y se ha realizado un gran esfuerzo en encontrar marcadores específicos. El proceso angiogénico se encuentra altamente regulado por diversos factores que participan en distintas vías de señalización entre las que destacan las mediadas por el VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) y el TGF- β (Transforming Growth Factor), los cuáles han sido nuestro objeto de estudio.

La búsqueda de marcadores específicos no se centra únicamente en su papel pronóstico, sino también como diana terapéutica, seguimiento de la eficacia del tratamiento antiangiogénico y predicción de la progresión tumoral.

La realidad es que la terapia antiangiogénica propuesta por Folkman en 1971 como tratamiento oncológico ha atraído una enorme atención durante las últimas décadas. El objetivo ha sido crear un agente citotóxico que afecte específicamente a la vascularización del tumor para eliminar su suministro de sangre causando una mínima repercusión en el resto de vasos que irrigan tejidos sanos (Folkman J., 1971; Duff SE et al., 2003).

2.3 VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor)

2.3.1. Aspectos generales

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF), es un potente mediador de la angiogénesis y la vasculogénesis tanto en el feto como en el adulto.

Fue descrito originalmente en 1983 como una proteína homodimérica que incrementaba la permeabilidad vascular en la piel, identificado a partir del fluido ascítico del cultivo de una línea celular de hepatocarcinoma de cobaya y denominado factor de permeabilidad vascular (VPF) (Senger DR. et al., 1983). En 1989, Ferrara y Henzel identificaron un factor de crecimiento para las células endoteliales en las células foliculares de la pituitaria bovina y lo llamaron VEGF, lo secuenciaron y encontraron que era idéntico a VPF (Ferrara N. et al., 1989).

Se expresa en múltiples células y tejidos, incluyendo el músculo esquelético y cardíaco, hepatocitos, osteoblastos, neutrófilos, macrófagos, queratinocitos, tejido adiposo marrón, células madre CD34+, células endoteliales, fibroblastos y células de músculo liso vascular.

VEGF *in vivo* induce y regula la angiogénesis, así como la permeabilización de los vasos sanguíneos, promueve la migración celular e inhibe la apoptosis. Su expresión es promovida por hipoxia y citoquinas tales como IL-1, IL-6, IL-8, la oncostatina M y TNF- α . Además, es quimiotáctica para los monocitos, atrayéndolos a los sitios donde se produce inflamación o desarrollo tumoral (Neufeld G. et al., 1999).

2.3.2. Estructura e isoformas

La familia de genes VEGF consta de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, estas glicoproteínas pertenecen a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye también el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés "Platelet-derived growth"). El factor VEGF-A está principalmente involucrado en la angiogénesis, mientras que VEGF-C y VEGF-D están implicados en la linfangiogénesis.

VEGF-A o VEGF como es habitualmente nombrada, tiene por lo menos 6 isoformas, todas ellas contienen exones 1-5. VEGF165 es la isoforma más potente en la inducción de la angiogénesis, mientras que VEGF165b la inhibe.

VEGF media sus señales a través de la unión con el receptor de tres tirosinas quinasas (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3). VEGFR-1 y VEGFR-2 se encuentran principalmente en el endotelio vascular, mientras que VEGFR-3 en el endotelio linfático. Se ha demostrado que la neuropilina (NRP-1), originalmente identificada como un receptor para mediadores neuronales también actúa como receptor específico de la isoforma VEGF165.

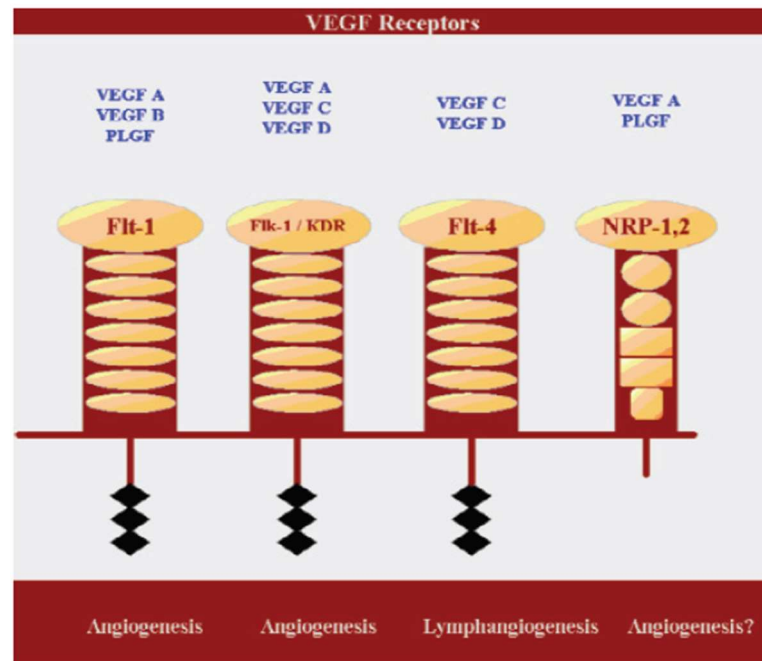


Figura 12. Receptores de VEGF.

2.3.3. Fisiología del VEGF

Durante la embriogénesis tanto los niveles de VEGF como sus receptores son esenciales para establecer una correcta red vascular. En ratones se ha comprobado que la ausencia de un único alelo produce la muerte embrionaria como consecuencia de una vascularización defectuosa.

En adultos sanos, la señalización de VEGF se limita a la cicatrización de heridas y al ciclo reproductor femenino.

En la cicatrización de las heridas es liberado por las plaquetas activadas, atrayendo neutrófilos y monocitos circulantes al sitio de la lesión como parte de la respuesta inflamatoria normal. VEGF aumenta la permeabilidad lo que favorece la formación de tejido de granulación y activa su receptor favoreciendo la proliferación y migración de células endoteliales.

Respecto al ciclo reproductivo femenino regula de forma bien coordinada el crecimiento y la angiogénesis en el desarrollo folicular y la fase lútea temprana (Byrne AM. et al., 2005).

2.3.4. Fisiopatología del VEGF

Alteraciones en su expresión contribuyen a la etiología de enfermedades caracterizadas por una angiogénesis anormal y al desarrollo de tumores sólidos.

2.3.4.1. VEGF Y ENFERMEDADES NO TUMORALES

Existen tres patologías en las que se ha encontrado un aumento de VEGF patológico: artritis reumatoide, retinopatía diabética y psoriasis.

La **artritis reumatoide** es una enfermedad autoinmune que afecta a la sinovial de las articulaciones, consiste en una inflamación persistente de la membrana sinovial que produce una destrucción progresiva de las mismas. VEGF juega un papel importante porque estimula la permeabilidad y la angiogénesis debido al ambiente hipóxico que se genera al aumentar la proliferación de las células sinoviales. Tanto los niveles de VEGF en líquido sinovial como en sangre se han visto aumentados respecto a sujetos normales.

En los pacientes diabéticos se han identificado niveles elevados de VEGF debido a que niveles altos de glucosa en sangre ejercen efectos tóxicos sobre el endotelio. Además, se han observado niveles elevados de VEGF en la retina de pacientes con **retinopatía diabética**, responsable de producir neovascularización, hemorragias y aumento de la permeabilidad vascular lo que conlleva deterioro visual e incluso ceguera.

Por último, la **psoriasis** es una enfermedad dermatológica causada por infiltrado de células inflamatorias y proliferación de vasos sanguíneos. En esta patología se ha visto que los queratinocitos de la piel sobreexpresan VEGF y sus receptores lo que conduce a una neovascularización (Byrne AM. et al., 2005).

2.3.4.2. VEGF Y CÁNCER

Tanto *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado que el aumento de su expresión está asociado al crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis por su capacidad de inducir permeabilización de los vasos sanguíneos formando fenestraciones en su membrana basal. De forma contraria, su inhibición suprime la angiogénesis inducida por las células tumorales y por tanto el crecimiento tumoral (Ferrara N. et al., 2002).

Para el crecimiento tumoral se requiere un suministro vascular para proporcionar nutrientes y oxígeno, esto se facilita por la secreción de las propias células tumorales de factores como el VEGF, que se unen a los receptores preexistentes del endotelio y estimulan la angiogénesis. Esta nueva red vascular proporciona también una nueva ruta por la cual las células pueden entrar a la circulación y formar metástasis a distancia (Weis S.M. et al., 2005).

Igualmente, los vasos linfáticos también ocupan un papel importante en el crecimiento tumoral y la aparición de metástasis. En este caso, el crecimiento de los vasos linfáticos se debe a la secreción aumentada por las células tumorales de la isoforma VEGF-C. Estos vasos linfáticos recogen líquido intersticial y células tumorales dando lugar a metástasis linfáticas.

Además de estimular la angiogénesis, parece que VEGF puede tener también una función autocrina como factor de supervivencia para las células tumorales protegiéndolos de las agresiones, tales como la hipoxia, la quimioterapia y radioterapia.

La producción elevada de VEGF por los tumores se ha asociado con aumento de la vascularización del tumor, metástasis, quimio-resistencia y un peor pronóstico en comparación con los tumores VEGF negativos (Byrne AM. et al., 2005). Se ha identificado que los niveles elevados de VEGF en plasma tienen un valor predictivo de progresión y metástasis en algunos tipos de cáncer, aunque se necesitan más estudios con solidez para interpretar estos datos (Hombrey E. et al., 2002).

VEGF puede considerarse por tanto un factor pronóstico, aunque no se sabe hasta el momento si se debe únicamente al aumento de la angiogénesis en el tumor o si desempeña otras funciones aparte.

Además de su papel como marcador pronóstico, su valor se ha acentuado por la incorporación de agentes antiangiogénicos a los regímenes estándar de quimioterapia de pacientes con CCR avanzado. Estudios recientes han demostrado la prolongación de la supervivencia en pacientes con CCR metastásico al añadir Bevacizumab (anti-VEGF) al tratamiento quimioterápico convencional (Los et al., 2007).

2.4 La superfamilia de TGF- β

Como ya hemos mencionado el proceso de angiogénesis se facilita a través de diferentes vías de señalización. La familia de citoquinas TGF- β (Transforming Growth Factor) comprende más de 40 factores incluyendo las isoformas clásicas de TGF- β 1, β 2, β 3, activinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs del inglés “Bone Morphogenetic Proteins”), entre otras. TGF- β 1 y TGF- β 3 se encuentran en condiciones fisiológicas en mayor proporción en el endotelio vascular y se asocian al correceptor Endoglina. TGF- β 2 se expresa en mayor medida en las células neuronales durante el desarrollo embrionario y se asocia al correceptor betaglicano (Jonker et al., 2014).

Estos factores de crecimiento juegan un papel crucial en procesos biológicos tales como embriogénesis, organogénesis, morfogénesis de tejidos como hueso o cartílago, vasculogénesis, angiogénesis, hematopoyesis, regulación inmune del desarrollo embrionario, así como en la patogénesis de una serie de enfermedades (Barbara NP et al., 1999).

En la señalización de TGF- β se han involucrado varios receptores: dos tipos de T β R-I, un tipo de T β R-II, ALK-1 (Activin receptor Like Kinasa 1) restringido al endotelio y ALK-5 de expresión muy extendida. La activación de estos receptores produce la fosforilación de unas moléculas señalizadoras llamadas Smad que propagan la señal al núcleo e inducen la expresión de genes diana. Las proteínas Smad son efectores nucleares y su función es regular los procesos celulares fundamentales (Pérez-Gómez et al., 2010). Existen tres tipos diferentes de Smad:

- Reguladas por receptores (R): Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8 son fosforiladas por ALK1 o ALK5. ALK1 a través de Smad1, Smad5 y Smad8 induce la proliferación y migración de las células endoteliales, mientras que ALK5 a través de Smad2 y Smad3 inhibe su proliferación y migración.
- Mediadoras comunes (Co): Smad4, regula la actividad transcripcional de una serie de dianas génicas.
- Inhibitorias (I): Smad6 y Smad7, impide la activación de las R-Smad al competir por el receptor, induciendo su degradación o defosforilación.

2.5. ALK-1 (Activin Receptor Like Kinasa 1)

ALK-1 es una proteína homodimérica transmembrana localizada en la superficie celular que actúa como receptor tipo I de la superfamilia TGF- β . Consta de 503 aminoácidos y su peso molecular es de unos 55-65 kDa. El gen que codifica la expresión de ALK-1 se denomina ACVRL1 (Activin A Receptor Type II-Like 1), se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 y está constituido por 11 exones.

Su tallo citoplasmático posee una región rica en glicina y serina (subdominio GS), seguida de un subdominio Ser/Thr quinasa que presenta un alto grado de similitud con otros receptores tipo I del TGF- β . Al interactuar con el receptor tipo II del TGF- β , éste fosforila los residuos serina localizados en ALK-1 y lo activa (Ten Dijke et al., 1994).

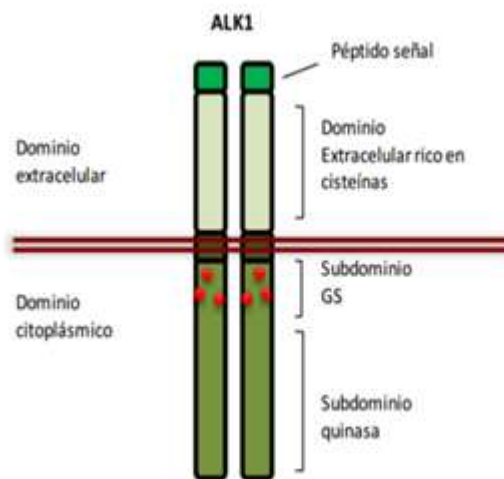


Figura 13. Representación esquemática de la estructura de ALK1.

En un principio, su expresión se halló en tejidos altamente vascularizados como el pulmón, la placenta y el corazón, posteriormente se halló en otras localizaciones (transición epitelio-mesénquima o TEM, monocitos, cardiomiocitos, mioblastos, fibroblastos de la piel, condrocitos, células esteladas hepáticas y células de la cresta neural).

Se postula que tiene un papel importante en la formación y remodelación de los vasos sanguíneos dado que se expresa en las células endoteliales durante la embriogénesis y en la etapa adulta. Además, la mutación del gen ALK-1 se ha relacionado con la HHT tipo II (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia o Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria) (Oh SP et al., 2000).

La familia de proteínas TGF- β está implicada en diversos procesos biológicos, incluyendo el crecimiento, la diferenciación y la inflamación. Concretamente el factor TGF- β 1 juega un papel importante en la remodelación vascular, pudiendo inhibir la actividad de otros factores angiogénicos y estimular la producción de proteínas de la matriz extracelular y los inhibidores de la proteasa. Sin embargo, TGF- β 1 tiene un efecto dual sobre la angiogénesis ya que puede inhibir o promover la formación de vasos sanguíneos. Este hecho se debe a que TGF- β puede activar dos cascadas de receptores con efectos opuestos en las células endoteliales: TGF- β /ALK5 a través de Smad2/3 inhibe la proliferación y migración de las células endoteliales, mientras que TGF- β /ALK1 induce la fosforilación de Smad1/5 y estimula ambos procesos (Lebrin F et al., 2004).

La Endoglina, receptor accesorio TGF- β , altamente expresada durante la angiogénesis, es esencial para la señalización de ALK1, estimulando su cascada e indirectamente inhibiendo la señalización de ALK5. En la ausencia de Endoglina la señalización de ALK5 predomina y se mantiene quiescente el endotelio.

2.6 Endoglina

2.6.1. Aspectos generales

La Endoglina (Eng), también llamada CD105, es una proteína homodimérica transmembrana que se expresa fundamentalmente en células endoteliales, tanto en arterias como en venas y capilares. El gen que la codifica se localiza en el brazo largo del cromosoma humano 9 y contiene 16 exones (Fernández-Ruiz et al., 1993).

Es un componente del complejo de receptores TGF- β , capaz de unir TGF- β 1 y TGF- β 3 con gran afinidad en presencia de los correspondientes receptores T β R-I y T β R-II. Dado que su papel en la señalización es indirecto se le ha denominado receptor tipo III (T β R-III) o correceptor. Se ha observado en estudios *in vitro* que es capaz de unir otros miembros de la superfamilia TGF- β por lo que podría estar implicada en otras vías de señalización.

Se identificó por primera vez a finales de la década de 1980 como un marcador de células endoteliales humanas mediante un anticuerpo monoclonal, creado para combatir una línea de células de linfoblastoma agudo y leucemia mielomonocítica. Dos años más tarde se

identificó como una glicoproteína de membrana presente en células endoteliales y fue entonces cuando se le acuñó el nombre de Endoglina (“Endo” por su expresión en endotelio, “g” y “l” por las iniciales de los apellidos de las autoras de la publicación y la terminación “in” corresponde a la terminación inglesa utilizada para proteínas “protein” (Gougos et Letarte, 1988). Otros estudios han demostrado que la Endoglina también se expresa en una amplia variedad de tejidos y tipos celulares como macrófagos, precursores eritroides, sincitiotrofoblastos de la placenta terminal, fibroblastos, células estromales, células del músculo liso, queratinocitos de la epidermis, así como en ciertos tumores.

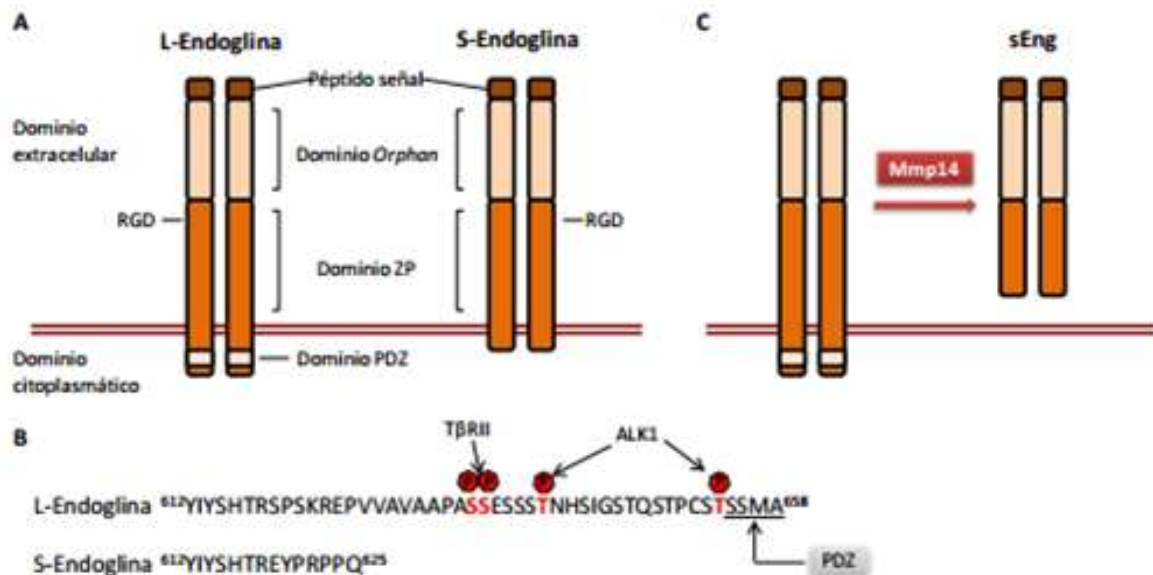
2.6.2. Estructura e isoformas:

La Endoglina es una glicoproteína homodimérica transmembrana de 180 kDa unida por puentes disulfuro. Presenta un dominio extracelular de gran tamaño, un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático rico en residuos de seronina y treonina que carece de actividad enzimática. En su dominio extracelular presenta un péptido señalizador N-terminal, un dominio huérfano y un dominio ZP (zona pelúcida). El dominio ZP está presente en muchas proteínas situadas extracelularmente y es donde se localiza el tripéptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), el cual se postula que está implicado en la adhesión celular (Gougos et Letarte, 1988; García-Pozo et al., 2008).

Se han descrito dos isoformas alternativas con capacidad de unir TGF- β , la isoforma larga (L- endoglina, del inglés “long”) y la isoforma corta (S- endoglina, del inglés “small”), se diferencian en la composición de sus colas citoplasmáticas. La isoforma predominante es la L- endoglina formada por 633 aminoácidos de los cuales 47 forman el tallo citoplasmático, la S- endoglina está compuesta por 600 aminoácidos con una corta cola citoplasmática de 14 aminoácidos. Ambas tienen en común los 7 residuos yuxtamembrana. Se ha postulado que ambas isoformas ejercen funciones opuestas, la L-endoglina tiene una función proangiogénica potenciando la señalización vía TGF- β /ALK-1, mientras que la S-endoglina promueve la señalización TGF- β /ALK-5 ejerciendo una función antiangiogénica (Pérez-Gómez et al., 2005; Bellón et al., 1993).

Existe una tercera forma denominada Endoglina soluble (solEng) y que corresponde al dominio extracelular unido a la membrana que se escinde proteolíticamente mediante la

acción de la metaloproteasa de membrana MT1 o MMP14 (Hawinkles et al.). Se han vinculado niveles elevados de solEng en la patogénesis de enfermedades vasculares graves como la esclerosis sistémica o la preeclampsia y en pacientes con cáncer respecto a sujetos sanos.



- A. Eng proteína homodimérica transmembrana.
- B. Secuencia aminoacídica del tallo citoplasmático de las isoformas L y S.
- C. La sEng se genera por un corte proteolítico en la región extracelular.

Figura 14. Representación esquemática de las isoformas de L-/S-endogлина y sEng.

Dado que la sEng conserva sitios de unión para los diferentes componentes de la familia TGF- β , podría actuar como un *scavenger*, impidiendo la unión de ligandos a sus receptores funcionales y por tanto inhibiendo la angiogénesis. Un hecho contradictorio en los pacientes con cáncer es que los niveles en los vasos tumorales son más elevados que en las células tumorales, lo que hace pensar que solEng deriva de la liberación por corte de la endogлина transmembrana, representando un marcador indirecto de la actividad angiogénica. Paradójicamente pacientes con elevados niveles de solEng tienen una peor evolución, pero se necesitan de más estudios para dar un valor correcto a sus niveles (Pérez-Gómez et al., 2005).

2.6.3. Funciones biológicas

Desde un punto de vista experimental, se ha demostrado que la Endogлина resulta esencial para la señalización del TGF- β en las células endoteliales. Presenta un importante papel en la angiogénesis y la desregulación de su expresión se ha implicado en enfermedades vasculares múltiples, HHT (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia), preeclampsia y en la angiogénesis tumoral.

Como previamente hemos mencionado la Endogлина se considera un receptor de TGF- β tipo III (T β R-III), que sólo se une a ligandos cuando se asocia al T β R-II. Además de ésta interacción dependiente, también se ha visto que puede interactuar de forma independiente con T β R-II y T β R-I (ALK1 y ALK5), además de otros ligandos TGF- β , incluyendo activinas y BMP (Bone Morphogenetic Proteins) (Ten Dijke et al., 1994).

En su ausencia se ha visto que las células endoteliales no crecen y la vía de señalización mediada por ALK1 queda suprimida, al contrario que la vía mediada por ALK5 que se estimula. De esta forma se concluye que la Eng es una reguladora del crecimiento de las células endoteliales mediada por TGF- β al estimular la señalización de TGF- β /ALK1 e inhibir TGF- β /ALK5, promoviendo así la activación de la angiogénesis (García-Pozo et al., 2008).

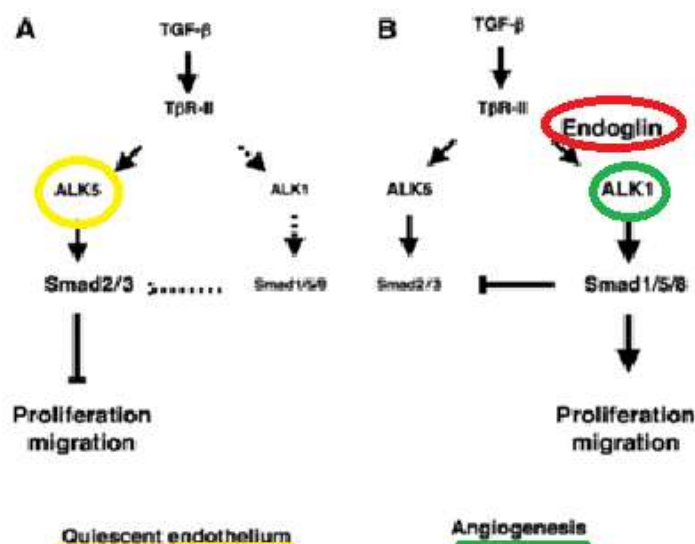


Figura 15. Modelo de regulación de la angiogénesis.

2.6.4. Patología asociada a mutación del gen de la Endogлина:

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, HHT del inglés “Hereditary hemorrhagic telangiectasia” o síndrome de Osler-Rendu-Weber, es un trastorno vascular autosómico dominante caracterizado por displasia vascular multisistémica. Se forman pequeños vasos sanguíneos dilatados (telangiectasia) y malformaciones arteriovenosas (MAV) en pulmón, hígado y cerebro, lo que produce recurrentes hemorragias. Tiene una incidencia de aproximadamente 1 de cada 10.000 habitantes y se manifiesta más frecuentemente durante la pubertad.

Existen dos tipos de HHT, HHT1 y HHT2, relacionadas con mutaciones en el gen de la endogлина y ALK1 respectivamente. HHT1 es más prevalente y tiene un inicio más temprano. Recientemente, otro gen de la familia TGF- β , el gen del factor de transcripción Smad4, ha sido implicado en un tipo de HHT juvenil asociada a poliposis que carece de mutaciones en la endogлина y ALK1. Este síndrome se ha denominado JP-HHT (Juvenile Polyposis Syndrome) (Fernández-L A. et al., 2006).

2.6.5. Endogлина y cáncer:

La gran mayoría de los estudios que relacionan la Eng con el cáncer se han centrado en su función proangiogénica y su utilidad como marcador de densidad vascular (MVD, del inglés “microvessel density”). Sin embargo, existen pruebas de que la Eng también interviene en la proliferación celular, la adhesión y la migración de células neoplásicas, lo que sugiere una participación directa en el desarrollo del cáncer a través de su vía dependiente de TGF- β o de sus mecanismos independientes (Pérez-Gómez et al., 2010).

Varios estudios han confirmado que el uso de anticuerpos anti-Endogлина como marcador de MVD es más sensible y tiene mejor valor pronóstico que otros anticuerpos contra marcadores tales como CD34, CD31 y factor de von Willebrand (vWF) (Bernabeu C et al., 2009).

Se ha encontrado una elevada expresión de Endogлина en células endoteliales de tumores sólidos, por lo que se ha considerado un marcador de neoangiogénesis en tumores de la glándula mamaria, próstata, cuello uterino, colon y recto, pulmonar, cabeza y cuello, riñón, esófago y útero. También se ha observado en tumores hematopoyéticos como el

mieloma múltiple y la leucemia de células peludas (Burrows FJ et al., 1995; Li C et al., 2001; Kassouf W et al., 2004; Akagi K et al., 2002; Tanaka F et al., 2001; Saad R.S. et al., 2005)

La densidad de microvasos (MVD) es un indicador pronóstico independiente de recurrencia, metástasis y supervivencia en tumores sólidos según lo publicado en algunos estudios, que se contradice con lo dicho en otros artículos. Su significado por tanto continúa sin estar definido y debe interpretarse con cautela (Dassoulas K. et al., 2010).

La Endoglina soluble o solEng se ha visto aumentada en el suero o plasma de pacientes con cáncer de mama, colorrectal y otros tumores sólidos y se ha relacionado en algunos estudios con el estadio tumoral y con un peor pronóstico (Takahashi N. et al., 2001). Su papel en el CCR es contradictorio y hay distintas hipótesis en la bibliografía actual. No existe una evidencia clara de que pueda ser usado como marcador de recurrencia local (Gomceli I. et al., 2012) y la influencia de la quimioterapia y los tratamientos antiangiogénicos sobre sus niveles sigue sin estar definida (Li C. et al., 2003). De forma contradictoria, la solEng parece tener una función antiangiogénica en la preeclampsia y otras enfermedades vasculares. Una explicación a este hecho podría ser que su producción es un evento tardío en la carcinogénesis y su función antiangiogénica sería irrelevante.

Actualmente permanece en estudio la función que ejerce la Endoglina en el tejido estromal que soporta las células tumorales y su papel en la progresión tumoral. Más estudios deben realizarse para una completa comprensión de su función e implicación en el desarrollo del cáncer.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 JUSTIFICACIÓN

Nuestro estudio se centra en un importante problema de salud pública como es el cáncer colorrectal, actualmente es el primer tumor más frecuente en ambos sexos en Europa y la segunda causa de mortalidad relacionado con cáncer tanto en Europa como en Estados Unidos. Aunque el CCR está asociado con una supervivencia del 90% a los 5 años en estadios precoces, el 20% de pacientes presentará enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico con una supervivencia del 10% a los 5 años.

El estadio clínico patológico (estadio TNM) es el único indicador pronóstico establecido, pero no predice la evolución clínica individual. La respuesta al tratamiento de los tumores clínicamente idénticos no siempre es la misma, por lo que es muy importante saber la agresividad tumoral mediante la identificación de marcadores para predecir la progresión tumoral de la enfermedad.

Se ha intentado correlacionar el estadio clínicopatológico con alteraciones moleculares con éxito limitado, tras cuatro décadas de investigación sobre mecanismos moleculares del CCR se ha validado el uso de biomarcadores y se han aceptado como una herramienta útil en la práctica clínica diaria. Los principales objetivos de identificar y validar el uso de estos marcadores son:

- Detección temprana de adenomas y cánceres colorrectales en fases iniciales.
- Estratificación del riesgo, identificando individuos con alto riesgo de desarrollar CCR.
- Marcador predictivo de respuesta al tratamiento óptimo.
- Marcador pronóstico y de progresión tumoral.
- Reducción de costes médicos por individualización del tratamiento óptimo.

No existe hasta el momento un marcador molecular diagnóstico y pronóstico fiable y los estudios de progresión se basan en las características histopatológicas del tumor. Por este motivo, nos hemos propuesto hacer un estudio molecular e inmunohistoquímico del CCR basándonos en conocidos marcadores de angiogénesis (VEGF y Endoglin), observando su comportamiento en el CCR, valorando su utilidad como marcadores de progresión y recurrencia, y comparándolo con lo escrito en la bibliografía actual.

2 HIPÓTESIS

En el momento actual el cáncer colorrectal tiene una alta incidencia y mortalidad. En las últimas décadas se ha demostrado la importancia de obtener un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que lo rigen y la necesidad de afinar en el pronóstico y tratamiento individual de cada paciente.

Por estos motivos y dada la variabilidad de resultados encontrados en la bibliografía reciente, las hipótesis planteadas en este estudio fueron las siguientes:

- 1.** La expresión de Endoglin y VEGF está aumentada en el tejido tumoral y tiene un papel importante en el proceso de carcinogénesis del cáncer colorrectal en todos sus estadios, pudiendo emplearse como marcador tumoral.
- 2.** Los valores de VEGF en plasma tienen relación con la progresión tumoral considerada como recurrencia o aparición de metástasis.
- 3.** Los valores de Endoglin en plasma tienen relación igualmente con la progresión tumoral pero dado su efecto dual tiene una mayor variabilidad.
- 4.** La tinción específica por inmunohistoquímica de la Endoglin en el tejido tumoral está relacionada con la agresividad tumoral y varía en función del estadio tumoral en el que se encuentre el CCR.

3 OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en nuestro estudio fueron los siguientes:

- 1.** Estudio de las características demográficas y seguimiento de los pacientes incluidos con CCR durante un determinado período de tiempo.
- 2.** Análisis histológico y molecular de VEGF y Endoglina en el tejido tumoral extraído tras la intervención quirúrgica y comparación de sus diferencias entre estadios y otras variables.
- 3.** Determinar el papel de VEGF y Endoglina en el diagnóstico y pronóstico de la evolución tumoral desde los estadios menos agresivos hasta los de mayor malignidad y metástasis, basándonos en sus niveles en plasma en forma soluble.
- 4.** Valorar la importancia de la determinación de VEGF y Endoglina en pacientes con tumores colorrectales, para futuros tratamientos más personalizados, así como en el seguimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS PARTICIPANTES

Se trata de un estudio observacional retrospectivo en el que participaron 133 pacientes con cáncer colorrectal pertenecientes a la Unidad de Coloproctología del Hospital Universitario La Paz, con un periodo de seguimiento máximo de dos años.

Las muestras recogidas de cada paciente, exceptuando aquellas en las que surgió algún problema de carácter intraoperatorio, organizativo o técnico fueron:

- Tejido tumoral y no tumoral de la pieza quirúrgica.
- Plasma intraoperatorio, a los 3, a los 6 y a los 9 meses aproximadamente (se intentó cumplir los intervalos de tiempo lo más estrictamente posible teniendo en cuenta las citas de revisión).

Todos los pacientes que participaron en el estudio fueron presentados en el Comité Multidisciplinar de Tumores de Coloproctología y se les realizó intervención quirúrgica programada en la Unidad de Coloproctología.

Todos cumplían los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión.

1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes adultos mayores de 18 años con cáncer de colon o recto histológicamente confirmados o pólipos cólicos.
- Firma del Consentimiento Informado de acuerdo con el protocolo del estudio autorizado por el Comité Ético del hospital adjuntando hoja de información sobre el proyecto y firma del Consentimiento del Biobanco (Anexos 1,2 y 3).
- Diagnóstico clínico, hemograma y bioquímica con CEA, colonoscopia con biopsia y TC toraco-abdomino-pélvico.
- En cáncer de recto, RM pelvis y ecografía endoanal. En enfermedad metastásica PET según criterio médico.
- Presentación del caso en el Comité Multidisciplinar de Tumores de Coloproctología e intervención quirúrgica programada en la Unidad de Coloproctología.

1.2 Criterios de exclusión

- Pacientes que se negaron a firmar los consentimientos informados obligatorios para ser incluidos en el estudio.
- Pacientes intervenidos de urgencia.
- Pacientes diagnosticados de síndrome de Lynch.
- Tumores de estirpe patológica distinta a adenoma o adenocarcinoma.

2 VARIABLES

Para la realización de este trabajo se ha diseñado una base de datos en la que se incluyen las variables clínicas, anatomopatológicas y moleculares descritas a continuación.

2.1 Variables clínicas

- **Demográficas:**

Edad y sexo (H/M).

- **Relacionadas con el tumor:**

Localización: por colonoscopia. En cáncer de recto también se usa la RM pélvica para estadiaje y localización.

- ✓ Colon ascendente.
- ✓ Colon transverso
- ✓ Colon descendente
- ✓ Sigma
- ✓ Tumor sincrónico
- ✓ Recto: superior, medio e inferior

Estadio TNM clínico: El American Joint Cancer Committee establece la clasificación TNM y los distintos estadios para el cáncer colorrectal (ver tabla 8 y 9). La estadificación se divide según la extensión del tumor en función de estos tres parámetros:

- ✓ Extensión (T): grado de infiltración tumoral en la pared del intestino grueso.
- ✓ Ganglios afectados (N): indica si hay afectación de ganglios locorregionales.
- ✓ Metástasis (M): indica si existe invasión de otros órganos a distancia.

TUMOR PRIMARIO (T)	
Tx	El tumor primario no se puede evaluar
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de lámina propia
T1	Invade submucosa
T2	Invade muscular propia
T3	Invade los tejidos pericólorrectales a través de la muscularis propia
T4a	Penetra la superficie del peritoneo visceral
T4b	Invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)	
NX	Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
N1a	Metástasis en uno de los ganglios linfáticos regionales
N1b	Metástasis en 2-3 de los ganglios linfáticos regionales
N1c	Depósito de tumor en subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales sin metástasis en los ganglios linfáticos
N2	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales
N2a	Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales
N2b	Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Metástasis confinada a un órgano o lugar (hígado, pulmón, ovario, etc.).
M1b	Metástasis en más de un órgano o en el peritoneo

Tabla 8. Clasificación TMN versión 1.2016 del AJCC (American Joint Committee on Cancer) y la UICC (Unión Internacional contra el cáncer)

Estadio	TNM
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio I	T1-2 N0
Estadio IIA	T3 N0 M0
Estadio IIB	T4a N0 M0
Estadio IIC	T4b N0 M0
Estadio IIIA	T1-2 N1/N1c T1 N2a
Estadio IIIB	T3-4 N1/N1c T2-3 N2a T1-2 N2b
Estadio IIIC	T1-4 N2b T3-4a N2b T4b N1-2
Estadio IVA	Tx Nx M1a
Estadio IVB	Tx Nx M1b

Tabla 9. Correlación entre los distintos sistemas de estadificación del CCR.

▪ **Relacionadas con la cirugía:**

Fecha de la cirugía.

Intervención quirúrgica: colectomía derecha, transversa, izquierda o subtotal, resección segmentaria, RAA (resección anterior alta), RAB (resección anterior baja), AAP (amputación abdominoperineal) u otras no incluidas en las previas.

▪ **Tratamiento recibido:**

Neoadyuvancia (en tumores de recto)

Adyuvancia

▪ **Seguimiento:**

Estado al final del seguimiento: Vivo o exitus (fecha).

Recidiva: ausente, local o en otra localización y meses transcurridos.

Metástasis: momento de aparición (previas o posteriores a la cirugía), localización y meses transcurridos.

2.2 Variables anatomopatológicas

- **Según biopsia de colonoscopia:**

Pólipo

Adenocarcinoma

- **Estadio TNM patológico (estudio pieza quirúrgica):**

El estadio patológico (pTNM) se determina tras la cirugía mediante el examen anatomopatológico de la pieza quirúrgica. En el caso de los tumores de recto, se considera subestadificación o *downstaging* cuando se constata una disminución de al menos un estadio con respecto al estadio clínico inicial según la última clasificación TMN (versión 1.2016) del AJCC (American Joint Committee on Cancer) y la UICC (Unión Internacional contra el cáncer).

La guía clínica de la NCCN recomienda que el análisis patológico incluya los siguientes parámetros: grado de diferenciación tumoral, profundidad de penetración (T), número de ganglios linfáticos extirpados y número de ganglios positivos (N), estado de los márgenes proximal, distal y radial, invasión linfoscavular, invasión perineural y depósitos tumorales extranodales.

En el cáncer de recto debe incluirse también el margen de resección circunferencial (se considera positivo cuando el MRC es ≤ 1 mm) y el efecto del tratamiento neoadyuvante. En este caso, la respuesta histopatológica se ha establecido según los criterios de Dworak (Tabla 10).

GRADO DE REGRESIÓN TUMORAL (DWORAK, 1997)	
0	No hay regresión.
1	Mínima regresión.
2	Moderada regresión.
3	Buena regresión.
4	Regresión completa.

Tabla 10. Índice de Dworak.

La resecabilidad fue definida como la resección macroscópicamente completa del tumor y de los ganglios patológicos. El estudio de los márgenes quirúrgicos define el grado de resección tumoral en tres grupos:

- ✓ R0: resección completa con márgenes libres.
- ✓ R1: resección incompleta con infiltración microscópica de los márgenes.
- ✓ R2: resección incompleta con infiltración macroscópica de los márgenes.

2.3 Variables moleculares:

▪ Endoglin:

Como proteína de membrana en tejido tumoral y no tumoral de la pieza quirúrgica, por tinción inmunohistoquímica (IHQ) y por detección de su expresión de RNA mediante RT-PCR cuantitativa.

En su forma soluble (solEng) en plasma preoperatorio, a los 3, 6 y 9 meses, mediante kits comerciales de ELISA.

▪ VEGF:

Como proteína de membrana en tejido tumoral y no tumoral de la pieza quirúrgica, por detección de su expresión de RNA mediante RT-PCR cuantitativa.

En su forma soluble mediante kits comerciales de ELISA, en plasma preoperatorio, a los 3, 6 y 9 meses.

3 ÉTICA Y LEGISLACIÓN

Para el desarrollo de este estudio se ha respetado el derecho de privacidad de los pacientes protegido por el consentimiento informado y regulado por la “Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

De la misma manera para el diseño del presente estudio se han respetado los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (Anexo 4), en la Declaración Universal de la UNESCO y se cumplen todos los requisitos de la legislación española.

El promotor del ensayo fue el Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) contando con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz. (Anexo 5).

Previo a la inclusión del paciente en el estudio se han firmado dos consentimientos informados. En el primero se solicita la participación en este proyecto de investigación con financiación y apoyo del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) y el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), con el objetivo principal de estudiar la implicación de las moléculas VEGF y Endoglin en el cáncer colorrectal (Anexo 1 y 2). El segundo es el consentimiento informado general del Biobanco para la obtención/cesión de material biológico y datos asociados del BIOBANCO IdiPAZ (Anexo 3).

La cesión de muestras del Biobanco IdiPAZ cumplió la normativa vigente y se ajustó a lo previsto por la Ley 12/2007 de Investigación Biomédica y al RD de biobancos 1716/2011.

Los datos personales de los pacientes incluidos fueron los necesarios para cubrir los objetivos del proyecto y son conocidos exclusivamente por el equipo investigador implicado en el estudio.

4 MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO

Dentro de los medios empleados y que han permitido llevar a cabo este proyecto destacan:

- Unidad de Cirugía Colorrectal del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, integrado por varios cirujanos con experiencia en cirugía colorrectal, ubicada en la 3ª planta del edificio General del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Paseo de La Castellana, 261. 28046 Madrid.
- Unidad de Oncología del Hospital Universitario La Paz de Madrid, ubicada en la 1ª planta del edificio Dotacional, con la colaboración de oncólogos en el seguimiento de los pacientes y equipo de enfermería en la recogida de muestras de plasma a los 3, 6 y 9 meses.

- Servicio de Anatomía Patológica e Histología, ubicado en la 1ª planta del edificio de Maternidad, equipado con todo el material necesario para la evaluación histológica de los tejidos.
- Biobanco IdiPAZ, servicio de apoyo a la investigación del Instituto de Investigación Biomédicas del Hospital Universitario La Paz, ubicado al lado del Servicio de Anatomía Patológica, ha facilitado el procesamiento y almacenamiento de las muestras biológicas recogidas. Dispone de una unidad de conservación de muestras: cámara fría, frigoríficos y dos sistemas de almacenamiento de muestras en nitrógeno líquido en varios congeladores (-30 y -80°C).
- Quirófanos, unidades de reanimación, camas de hospitalización y servicios centrales hospitalarios (laboratorios de bioquímica, radiología, etc.), que han contribuido en una buena calidad asistencial de los pacientes.
- Laboratorio para la investigación del departamento de Medicina Celular y Molecular del CIB (CSIC), localizado en calle Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid. Liderado por la Dra. Luisa Botella Cubells con una amplia experiencia en investigación sobre diagnóstico genético y marcadores moleculares de enfermedades vasculares, en concreto la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Cuentan también con una amplia experiencia en técnicas de inmunohistoquímica de Endoglin en cortes histológicos y en su forma soluble en sangre por ELISA, así como en medición de mRNA y factores de crecimiento (VEGF, Seng, FGF, etc.).
- Comunidad de Cálculo Científico del CSIC. Secretaría General Adjunta de Informática (SGAI). Localizada en calle Pinar, 19, 28006 Madrid. Con la colaboración imprescindible en la estadística aplicada de Laura Barrios Álvarez.

5 DESARROLLO DEL ESTUDIO

5.1 Primera fase

- Selección de pacientes incluidos en el estudio, se firmará el consentimiento informado antes de proceder a la evaluación que consistirá en historia clínica y exploración física.
- Extracción de las muestras histológicas y de plasma de los pacientes sometidos a intervención quirúrgica por carcinoma o adenoma de colon y recto.

- Transferencia de muestras biológicas desde el quirófano al Departamento de Anatomía Patológica y al Biobanco, manteniendo la viabilidad óptima del plasma y de los tejidos humanos.
- Etiquetado de la muestra y embalaje necesario para preservar su integridad y viabilidad.
- Puesta a punto de la técnica de inmunohistoquímica.

El Departamento de Anatomía Patológica será el responsable del tallado de las muestras e inclusión en parafina.

El Biobanco será el responsable de la congelación de tejido fresco no tumoral y tumoral (criomoldes) y de centrifugar y almacenar las muestras de plasma.

5.2 Segunda fase

- Extracción de sangre periférica de los pacientes incluidos en el estudio a los 3, 6, 9 y 12 meses de la cirugía en el Hospital de Día de Oncología donde acuden a revisiones periódicas. Igualmente se centrifugan y almacenan en el Biobanco del Hospital Universitario La Paz.
- Transporte de las muestras al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB).
- Ordenamiento de las muestras y comienzo de las mediciones de Eng y VEGF en el suero y en las muestras histológicas.
- Introducción de variables en base de datos.

5.3 Tercera fase

- Revisión de la evolución clínica de cada paciente.
- Estudio estadístico.
- Análisis global de los resultados.
- Tesis Doctoral y publicaciones.

5.4 Cronograma

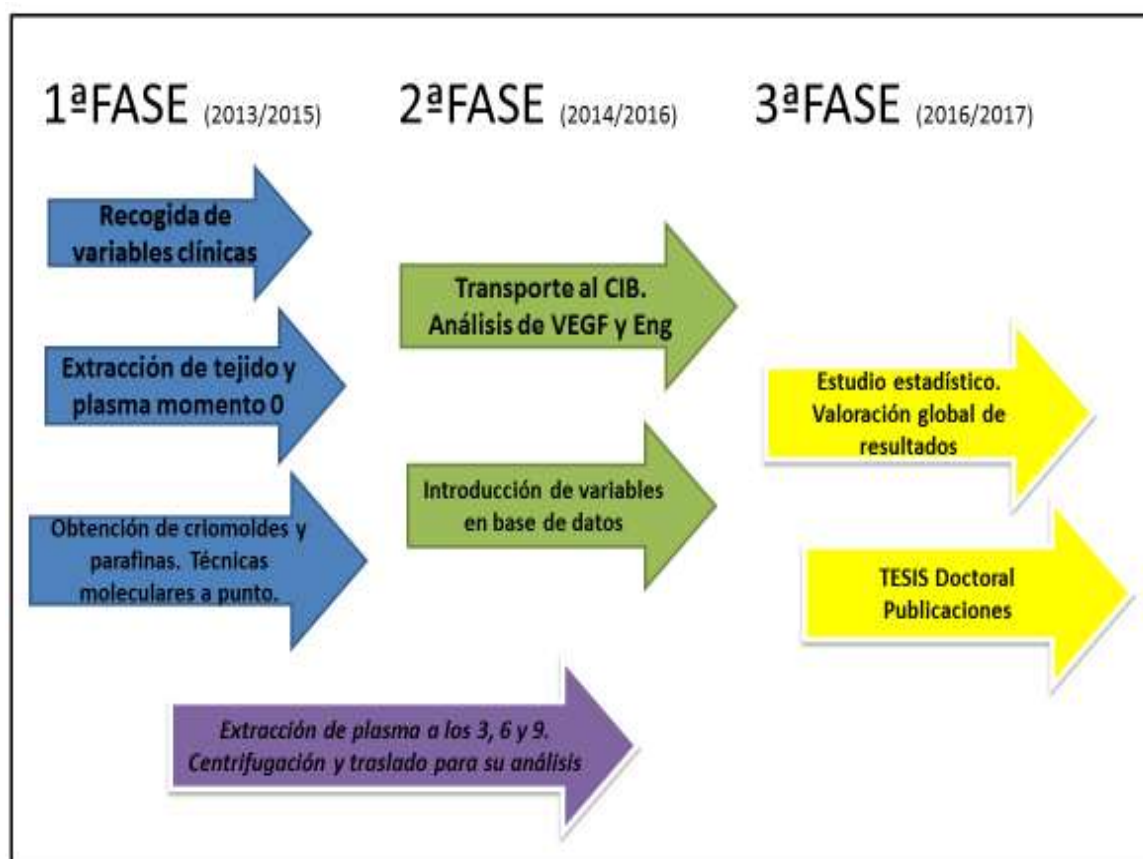


Figura 16. Cronograma del estudio de investigación organizado en tres fases.

6 INFORMACIÓN TÉCNICA

6.1 Muestras de plasma

▪ Obtención de las muestras:

1. Realizar la extracción de sangre periférica de los donantes utilizando EDTA (Etilendiaminotetracético) como anticoagulante. Es recomendable recoger entre 8 - 10 ml y dos alícuotas por donante.
2. Centrifugar las muestras durante 15 minutos a 1000xg. Se recomienda realizar la centrifugación antes de que haya transcurrido 1h tras su extracción.
3. Se realizan alícuotas de 800 - 1000 μ L en tubos cónicos eppendorf de 1,5 mL.
4. Se almacenan las muestras a -80°C hasta su análisis con kits de ELISA correspondientes.

▪ **Protocolo de detección:**

Determinado mediante la técnica de ELISA siguiendo las instrucciones de los kits comerciales: Endoglin Instant ELISA (Affymetrix, Sta. Clara, CA, Estados Unidos) y Human VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), respectivamente. Todas las muestras fueron medidas por duplicado.

6.1.1 Protocolo de análisis de Endoglin soluble

A continuación, se desarrolla el protocolo de análisis de Endoglin Instant ELISA (Affymetrix, Sta. Clara, CA, Estados Unidos).

1. El kit tiene una placa de 96 pocillos de poliestireno con un anticuerpo monoclonal antiendoglin humana ya inmovilizado. Se añade 100µL por pocillo de tampón RD1S que contiene una base proteica y preservantes.
2. Se añade 50µL por pocillo de la proteína estándar (Endoglin humana recombinante con la que se realiza una recta patrón mediante diluciones seriadas), o de la muestra a ensayar. La mezcla se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 500±50 rpm.
3. Se aspira el contenido de cada pocillo y se realiza un lavado con un tampón que contiene surfactante; se repite el proceso 4 veces.
4. Se añaden 200µL por pocillo de una solución de anticuerpo monoclonal anti-endoglin humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incuba durante otras 2 horas a temperatura ambiente en el agitador.
5. Se repiten otros 4 ciclos de aspirado/lavado.
6. Se añaden 200µL por pocillo de solución sustrato conteniendo una mezcla 1:1 de peróxido de hidrógeno y el cromógeno 3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina (TMB). Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz.
7. Se añaden 50µL de solución de parada (ácido sulfúrico 2N) y se determina la densidad óptica en los 30 minutos siguientes, a 450nm empleando el equipo Glomax, multidetection system de Promega.

6.1.2 Protocolo de análisis de VEGF en plasma

Análisis de VEGF con el kit de Human VEGF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos) según el protocolo establecido:

1. Se preparan las muestras de plasma, controles de calibración (estándares) y reactivos según las instrucciones del manufacturado.
2. Para muestras de plasma se añade 100 µL de diluyente RD1W a cada pocillo y 100 µL de patrón estándar, control o muestra por pocillo. Se cubre con una tira adhesiva y se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas.
3. Se aspira y se lava cada pocillo, repitiendo el proceso 3 veces, con 400 µL de tampón de lavado. Después del último lavado se seca bien los pocillos, por aspiración del líquido, y se invierte la placa sobre papel absorbente.
4. Se añade 200 µL de conjugado de VEGF a cada pocillo y se cubren los pocillos de nuevo con tiras adhesivas. Se incuba 2 horas a temperatura ambiente.
5. Se repiten los lavados como en el paso 3.
6. Se añade 200 µL of substrato de reacción a cada pocillo. Se tapa para proteger de la luz. Se esperan 20-25 minutos a que la reacción tenga lugar.
7. Se para la reacción de peroxidasa con 50 µL de “Stop Solution” en cada pocillo.
8. Se determina la densidad óptica de cada pocillo mediante un lector de placas a 450 nm.

6.2 Muestras histológicas

6.2.1 Criomoldes

6.2.1.1. CONGELACIÓN DE TEJIDO FRESCO TUMORAL Y NO TUMORAL

1. Embeber la muestra en O.C.T.¹ en el criomolde² eliminando las posibles burbujas de aire.
2. Sumergir en isopentano³ a -80 °C.
3. Extraer y almacenar en cajas en congelador a -80 °C.

¹O.C.T.: Tissue-Tek® Sakura 4583 O.C.T.™ Compound, 12 x 125 mL

²Criomolde: Tissue-Tek® Sakura 4557 Cryomold® Standard 25 x 20 x 5 mm, 100/pcs

³Isopentano: 2-Methylbutane GPR RECTAPUR®

6.2.1.2. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE CRIOMOLDES (OCT)

1. Homogeneizar tejido (biopsias tumorales incluidas en O.C.T (criomoldes):
 - Recoger las muestras almacenadas a -80°C y transportarlas en hielo seco.
 - Limpiar todas las piezas del criotomo con una solución RNase-away. Hacer los cortes a -30°C.
 - Colocar la muestra en el criotomo y prepararla como para cortar secciones para IHC.
 - Eliminar todo el O.C.T posible de alrededor del tejido.
 - Cortar (no hace falta la pieza de cristal). Mientras se corta dejar que las secciones se deslicen y colocar estas secciones en un tubo RNase-free con las pinzas (lavadas con RNase-away).
 - Cortar 10 secciones de 10µm (Si son tejidos fibróticos: 25 secciones de 4µm) aproximadamente entre 20-30 mg
 - Añadir la solución de lisis para iniciar la extracción del RNA, proporcionada por el kit comercial de extracción de RNA de Machery-Nagel (Dueren, Germany).
2. Lisar células:
 - Añadir 600 µl Buffer RA1 y 6 µL de β-Me al tejido y voltear enérgicamente.
3. Filtrar el lisado:
 - El lisado debe homogeneizarse primero usando una aguja de 0.9 mm (20 gauge), 5 veces.
 - Reducir la viscosidad y limpiar el lisado mediante filtrado a través de NucleoSpin filter (anillo violeta). Colocar el NucleoSpin Filter in a Collection Tube (2ml), añadir la mezcla y centrifugar 1 min a 11000 x g.

En caso de formación de pellet visible, transferir el sobrenadante sin pellet a un nuevo tubo de 1.5 ml.
4. Ajustar las condiciones de unión del RNA:
 - Descartar el NucleoSpin filter y añadir 600 µl de etanol al 70% al lisado homogeneizado y mezclar mediante pipeteo (5 veces).

Tras la adición del etanol se puede observar un precipitado. Asegurarse de disgregar cualquier precipitado mezclando bien.

5. Unión RNA:

- Para cada preparación coger una columna NucleoSpin RNA (anillo azul clarito) y colocarla en un tubo. Pipetear bien el lisado 2-3 veces y cargarlo en la columna. Centrifugar 30 s a 11000 x g. Colocar la columna en un nuevo tubo (2ml).

Para volúmenes mayores centrifugar en dos tandas.

6. Desalar la membrana de sílica:

- Añadir 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) y centrifugar a 11000 x g durante 1 min para secar la membrana.

7. Digestión del DNA:

- Preparar la mezcla de reacción DNase en un tubo de 1.5 ml: 10 µl de rDNase reconstituida a 90 µl de Reaction Buffer for rDNase. Agitar el tubo para mezclar.
- Añadir 95 µl de la DNase reaction mixture directamente al centro de la membrana de sílica. Incubar 15 minutos.

8. Lavar y secar la columna de sílica:

- 1^{er} Lavado. Añadir 200 µL buffer RAW2 a la columna de NucleoSpin RNA. Centrifugar 30 s a 11000 x g. Poner la columna en un nuevo tubo (2ml)
- 2^º Lavado. Añadir 600 µL de Buffer RA3 a la columna. Centrifugar 30 s a 11000 x g. Eliminar lo eluido y poner la columna de nuevo en el tubo.
- 3^{er} Lavado. Añadir 250 µL de Buffer RA3 a la columna de Nucleospin. Centrifugar 2 min a 11000 x g y secar la membrana completamente. Poner la columna en un tubo RNase free 1.5 ml.

9. Eluir RNA:

- Eluir el RNA en 60 µL de RNase free H₂O y centrifugar a 11000 x g 1 min.

La cantidad de RNA obtenida se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (Bonsai Technologies Group, Madrid, España).

La contaminación de las muestras, con impurezas orgánicas e inorgánicas y proteínas, afecta de forma significativa a la sensibilidad y especificidad del resultado, por lo que también se comprobó la pureza del RNA, determinada mediante la relación de absorbancia (A) 260/280 y A 260/230, que debía estar comprendida entre los valores de 1,8 y 2.

6.2.1.3. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) POR RETROTRANSCRIPCIÓN (RT):

Un microgramo de RNA se retrotranscribió a cDNA de acuerdo con las instrucciones del kit de transcripción reversa *First strand cDNA synthesis kit* (Roche, Basilea, Suiza), utilizando como cebadores oligonucleótidos hexaméricos de secuencias obtenidas al azar (random primers). La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, Warrington, Gran Bretaña).

▪ **Protocolo para RT-PCR con AMV de Roche:**

Antes de preparar los tubos se debe medir la concentración de RNA en las muestras. Normalmente se trabaja con 1 µg de RNA de cada muestra. Si se quiere obtener cDNA para realizar PCR cuantitativas, lo mejor es hacer un duplicado para cada muestra, con lo que se necesita un total de 2 µg de RNA.

1 µg RNA (el resto de componentes vienen incluidos en el kit AMV)

2 µl *Random primers* → hexanucleótidos que se anillan al azar en todos los mRNAs.

2 µl dNTPs

4 µl ClMg₂

0.8 µl AMV Reverse Transcriptasa

1 µl RNase Inhibitor

2 µl Reaction Buffer

Volumen final = 20 µl (rellenar con H₂O libre de RNAasa)

Ciclos PCR:

25°C, 10 minutos → *annealing*

42°C, 60 minutos → síntesis de cDNA

99°C, 5 minutos → inactivación enzima

4°C, 5 minutos

4°C, 60 minutos

Conservar cDNA a -20°C hasta su uso. Si se utiliza en pocas horas o días puede conservarse a 4°C.

6.2.1.4. PCR CUATITATIVA A TIEMPO REAL (qPCR):

La PCR se realizó en el sistema de PCR a tiempo real iQ5 (Roche). Para ello, se utilizó la mezcla de reacción *iQ SyBR Green Supermix (BioRad)*, que contiene la polimerasa, el Mg2Cl, la mezcla de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), el tampón de reacción y SYBR-green I (BioRad) que es un fluoróforo que se intercala en DNA bicatenario uniéndose al surco menor del DNA y aumentando 1.000 veces su fluorescencia, relacionándose la intensidad de la señal con la cantidad de producto existente. Los cebadores utilizados para las reacciones de PCR en tiempo real fueron:

Endogлина

Directo: AGCCTCAGCCCCACAAGT

Reverso: GTCACCTCGTCCCTCTCG

VEGF

Directo: TCTACCTCCACCATGCCAAGT

Reverso: GCTGCGCTGATAGACATCCA

18S

Directo: CTCAACACGGGAAACCTCAC

Reverso: CGCTCCACCAACTAAGAACG

Se amplificó el RNA ribosómico de 18S humano, como control interno debido a su abundante expresión y que no varía a consecuencia de los mecanismos normales de regulación transcripcional. Se realizaron triplicados de cada muestra y de cada experimento, mostrándose la media de los experimentos.

▪ **Mezcla para PCR Cuantitativa con Sybr Green de Applied:**

1. Primero diluir 1/5 en H₂O DEPC 20 µM
2. Diluir el cDNA ½ en H₂O DEPC. De éste se usa para cada reacción:

2 µl cDNA (o 2 µl H₂O para NTC, ó 2 µl dil. 1/150 de cDNA para 18S)

0.5 µl primer directo

0.5 µl primer reverso

10µl Sybr Green mezcla de reacción 2X

7 µl H₂O: volumen final 20 µl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S Sybr Control	18S Sybr Control	18S Sybr Control	18S Sybr HHT1	18S Sybr HHT1	18S Sybr HHT1	18S Sybr HHT2	18S Sybr HHT2	18S Sybr HHT2	NTC 18S	NTC 18S	NTC 18S
B	IL-1B Sybr Control	IL-1B Sybr Control	IL-1B Sybr Control	IL-1B Sybr HHT1	IL-1B Sybr HHT1	IL-1B Sybr HHT1	IL-1B Sybr HHT2	IL-1B Sybr HHT2	IL-1B Sybr HHT2	NTC IL-1B	NTC IL-1B	NTC IL-1B
C	HGF Sybr Control	HGF Sybr Control	HGF Sybr Control	HGF Sybr HHT1	HGF Sybr HHT1	HGF Sybr HHT1	HGF Sybr HHT2	HGF Sybr HHT2	HGF Sybr HHT2	NTC HGF	NTC HGF	NTC HGF
D	CD80 Sybr Control	CD80 Sybr Control	CD80 Sybr Control	CD80 Sybr HHT1	CD80 Sybr HHT1	CD80 Sybr HHT1	CD80 Sybr HHT2	CD80 Sybr HHT2	CD80 Sybr HHT2	NTC CD80	NTC CD80	NTC CD80
E	CFB Sybr Control	CFB Sybr Control	CFB Sybr Control	CFB Sybr HHT1	CFB Sybr HHT1	CFB Sybr HHT1	CFB Sybr HHT2	CFB Sybr HHT2	CFB Sybr HHT2	NTC CFB	NTC CFB	NTC CFB
F	APOE Sybr Control	APOE Sybr Control	APOE Sybr Control	APOE Sybr HHT1	APOE Sybr HHT1	APOE Sybr HHT1	APOE Sybr HHT2	APOE Sybr HHT2	APOE Sybr HHT2	NTC APOE	NTC APOE	NTC APOE
G	CC3 Sybr Control	CC3 Sybr Control	CC3 Sybr Control	CC3 Sybr HHT1	CC3 Sybr HHT1	CC3 Sybr HHT1	CC3 Sybr HHT2	CC3 Sybr HHT2	CC3 Sybr HHT2	NTC CC3	NTC CC3	NTC CC3
H	Nibrin Sybr Control	Nibrin Sybr Control	Nibrin Sybr Control	Nibrin Sybr HHT1	Nibrin Sybr HHT1	Nibrin Sybr HHT1	Nibrin Sybr HHT2	Nibrin Sybr HHT2	Nibrin Sybr HHT2	NTC Nibrin	NTC Nibrin	NTC Nibrin

- 18S diluir 1/100 el cDNA para los pocillos de 18S
- NTC sin añadir cDNA añadir 1 microlitro agua
- Pocillo → 19 µl Master Mix + 1 µl cDNA

8 tandas para 12 pocillos Sybr green : 1
para cada gen 18S y genes del 1 al 7 (+1)
Master mix
Sybr (10uL)= 140 µl
Primers (0,5uL)x14 = 7 F+7 µl R
H2O hasta (20) 8x14= 112 µl

Figura 17. PCR Cuantitativa con Sybr Green de Applied

6.2.2 Parafinas

6.2.2.1. BLOQUES DE PARAFINA A PARTIR DE TEJIDO FRESCO NO TUMORAL Y TUMORAL

(CASSETTES):

1. Fijación de la muestra en formol dentro del cassette¹.
2. Procesado en Anatomía Patológica
3. Almacenado a 4 °C (se puede almacenar a temperatura ambiente).

¹ Cassette: Labonord 138 74082 Pink ultra-biopsy cassette.

6.2.2.2. DETECCIÓN DE ENDOGLINA EN MUESTRAS FIJADAS EN PARAFINA USANDO EL MÉTODO ABC (INMUNOHISTOQUÍMICA, IHQ):

Las muestras de tejido se fijaron en formalina para su posterior inclusión en parafina. Se realizarán cortes de 3-4 μm de espesor para cada una de las muestras obtenidas y fueron debidamente identificadas con el código asignado a cada paciente.

Para la visualización de Endoglina humana se utilizó el *anticuerpo monoclonal anti-endoglina humana SN6h de Dako (Nº de catálogo M3527)* siguiendo el procedimiento rutinario de IHQ utilizando el método ABC. El sistema cromógeno DAB, suero de bloqueo y hematoxilina, pertenecen a la casa comercial Dako (Nº de catálogo: K3468, X0909, S3309).

▪ **Protocolo detallado:**

1. Los cortes se desparafinaron durante una hora a 56°C e hidrataron sumergiéndolos durante cinco minutos en las siguientes soluciones: xileno, etanol absoluto, etanol de 90% y etanol de 70%. Por último, se lavó en agua destilada 10 minutos. A partir de ese momento, todas las incubaciones se realizarán en una cámara húmeda. Las muestras no deben secarse.
2. Los cortes desparafinados e hidratados se sometieron a un proceso de recuperación antigénica siendo tratados con una solución de Proteinasa K durante 30 minutos, se inactivó a la peroxidasa endógena con agua oxigenada durante 10 minutos y, por último, se bloquearon los sitios inespecíficos 30 minutos con una solución comercial: Protein Serum-Free (Dako, Glostrup, Dinamarca).
3. Los cortes se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal mouse-anti-human CD105 (SNh6) de DAKO a 4°C a una dilución 1/50 en la misma solución utilizada para el bloqueo.
4. Como anticuerpo secundario se utilizó el novedoso sistema Dako EnVision TM+Dual link-HRP de DAKO. El sistema se basa en un polímero que ya contiene la enzima HRP y que, a su vez, está conjugado con el anticuerpo secundario, en este caso de ratón.
5. La distribución de la peroxidasa se visualizó con diaminobencidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen system, DAKO).
6. Finalmente, los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y montaron con medio DPX (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, Estados Unidos).

7 ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado con el programa IBM SPSS v23. Los niveles de confianza se han establecido en el 95%. Se considera que una prueba es estadísticamente significativa cuando el valor de la p es menor de 0.05.

Los datos analizados corresponden a 133 individuos observados a través del tiempo (preoperatorio, 3m, 6m y 9m) y hasta la fecha final de seguimiento. Los efectos considerados han sido:

- Fijos a tiempo inicial: Sexo, edad, localización del tumor, biopsia del tumor por colonoscopia, intervención quirúrgica, neoadyuvancia (cáncer de recto), estadio TNM (en cáncer de recto cTNM e ypTNM).
- Factores variables en el tiempo: Recidiva local (SI, NO), metástasis (SI, NO), mes de aparición y localización. Adyuvancia (SI, NO). Exitus (SI, NO) y fecha.
- Variables respuesta: Criomolde Endogлина y VEGF. Plasma Endogлина y VEGF. Estas variables observadas de forma continua han sido categorizadas por rango como marcador tumoral para algunos análisis.

El análisis estadístico descriptivo se ha llevado a cabo mediante frecuencias para variables categóricas, perfil de la población en factores invariantes en el tiempo y factores que varían a través del tiempo. Se han empleado estadísticos básicos para descripción y estudio de la normalidad de las variables respuesta en las subpoblaciones definidas por los factores y para cada punto de tiempo estudiado.

En el contraste de hipótesis descriptivo se han realizado cruces entre variables categóricas y se ha medido estadísticamente la relación por medio del test de Chi-cuadrado con cálculo de pruebas exactas de Montecarlo. Hemos establecido relaciones entre factores invariantes en el tiempo y relaciones de los factores y efectos con Endogлина y VEGF clasificadas como marcadores tumorales.

Para los modelos explicativos de Endogлина y VEGF a través del tiempo se han considerado las variables dependientes a través de una transformación logarítmicamente normal por su falta de ajuste inicial a una distribución gaussiana. Se ha aplicado un Modelo Mixto Lineal de medidas repetidas en el tiempo tomado como efectos fijos principalmente

metástasis (SI/NO) y estadio TNM modificado (más agresivo/menos agresivo), aunque se consideraron otros efectos. En el caso del cáncer de colon, con mayor número de datos se ha podido contrastar la interacción de algunos efectos (agresividad del tumor y aparición de metástasis en el tiempo).

8 LIMITACIONES

Las limitaciones de este estudio han sido múltiples al tratarse de un estudio en ámbito clínico. La recogida de muestras a pesar de haber sido exhaustiva se ha visto obstaculizada diariamente por problemas en la extracción, transporte y procesamiento de las mismas. Estos problemas se han intentado subsanar principalmente por las investigadoras que firman pero que dependen de un trabajo en grupo coordinado.

Otra limitación ha sido el número de muestras obtenidas, menor de lo esperado, por lo que la potencia de los análisis estadísticos realizados se ha visto limitada.

A pesar de estas importantes limitaciones hemos logrado finalizar el estudio y obtener unos resultados satisfactorios que en parte discurren paralelos a las conclusiones de la bibliografía reciente y en parte abren nuevas incógnitas que deberán ser resueltas en futuros estudios.

Actualmente se está realizando un estudio con características similares que pretende corregir los fallos registrados, superar los problemas encontrados y obtener unos mejores resultados.

RESULTADOS

1 GRUPO GLOBAL: PACIENTES CON CCR

Este grupo recoge la población total a estudio y lo constituyen 133 pacientes. Es una población muy heterogénea que mezcla pacientes con cáncer de colon y de recto por lo cual la hemos dividido en dos grupos para un análisis más correcto y exhaustivo.

Desde el inicio del estudio, con la obtención de muestras del primer paciente en agosto de 2013 hasta la obtención de muestras del último paciente en marzo de 2015, se incluyeron un total de 137 pacientes de los cuáles 2 fueron excluidos por tener un cáncer de estirpe celular distinta a adenocarcinoma o pólipo (melanoma rectal) y 2 pacientes se consideraron perdidos por falta de seguimiento. El seguimiento de los pacientes se llevó a cabo hasta agosto de 2015, tres años después del inicio del estudio, de lo que se deduce que cada sujeto ha tenido un tiempo de seguimiento distinto según el momento de inclusión.

De cada paciente en estudio se intentó obtener tres tipos de muestras. Para el estudio tanto de VEGF como de Endoglina (Eng), se obtuvo tejido tumoral y no tumoral para medición del RNA y 4 muestras de plasma correspondientes al día de la cirugía, a los 3 meses, a los 6 meses y a los 9 meses. El estudio inmunohistoquímico en muestras de tejido tumoral y no tumoral fijado en parafina se realizó únicamente para Endoglina.

El seguimiento que hemos realizado en cada paciente se ha basado en recoger una serie de eventos para posteriormente analizar su relación con los niveles moleculares registrados en las distintas muestras. De estas variables cabe destacar lo siguiente:

- Recurrencia y recidiva: dado el escaso número registrado no ha sido posible incluirlo en el análisis estadístico y se ha incluido únicamente en el análisis descriptivo.
- Metástasis: en cada muestra obtenida hemos registrado si el paciente presentaba metástasis, por lo que hemos registrado 4 momentos distintos de posible aparición de metástasis (a los 0 meses o conocidas previas a la cirugía, a los 3, a los 6 y a los 9 meses), y un quinto momento de aparición de metástasis más tardío de los 9 meses que no se corresponde con la obtención de ninguna muestra.
- Localización de metástasis
- Adyuvancia
- Exitus

En la siguiente figura exponemos las muestras obtenidas de cada parámetro analizado, como hemos mencionado previamente, nos hemos encontrado con importantes obstáculos que nos han impedido obtener la totalidad de las muestras fijadas como objetivo inicial.

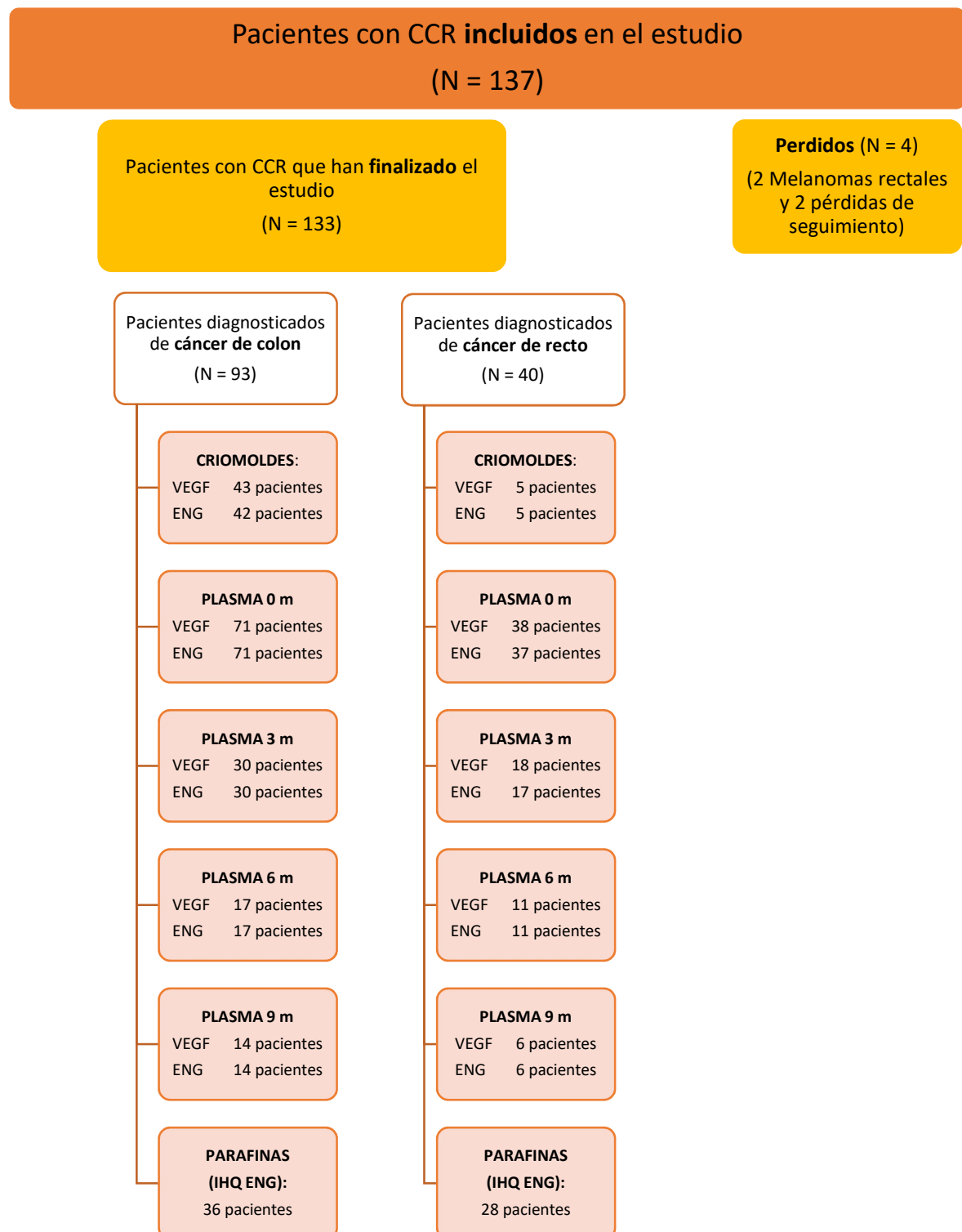


Figura 18. Muestras obtenidas de las variables estudiadas.

2 GRUPO CÁNCER DE RECTO

2.1 Análisis descriptivo de las variables clínicas y anatomopatológicas

Este grupo lo constituyen 40 pacientes, de los cuáles 26 eran varones (65%) y 14 mujeres (35%) (Figura 19). Respecto a la edad, 15 pacientes eran menores o igual a 65 años (37.5%) y 25 pacientes eran mayores de 65 años (62.5%) (Figura 20).

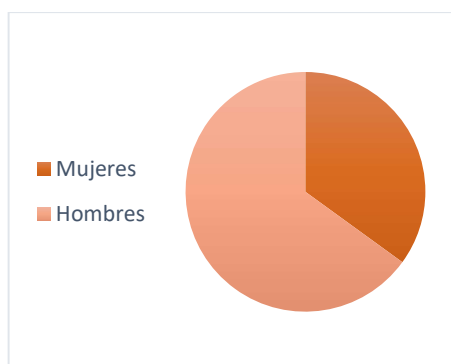


Figura 19. Distribución por sexo.

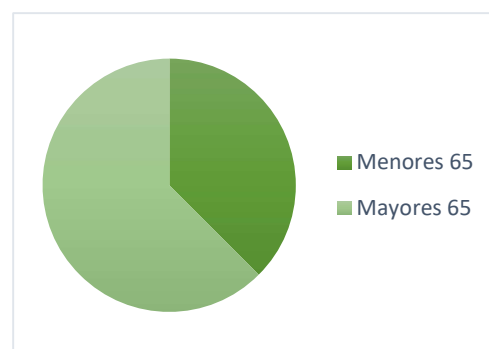


Figura 20. Distribución por edad.

Respecto a la localización del tumor por colonoscopia o resonancia magnética (RM), 13 se localizaron en recto alto (32.5%) y 27 en recto medio o bajo (67.5%) (Figura 21). En la biopsia tomada por colonoscopia tan sólo un tumor correspondió a un pólipo (2.5%) y los 39 restantes (97.5%) se diagnosticaron como adenocarcinoma (Figura 22).

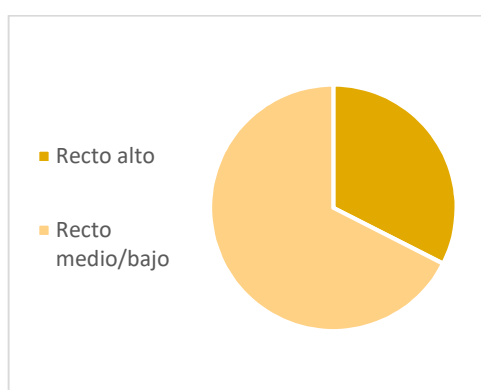


Figura 21. Localización del tumor.

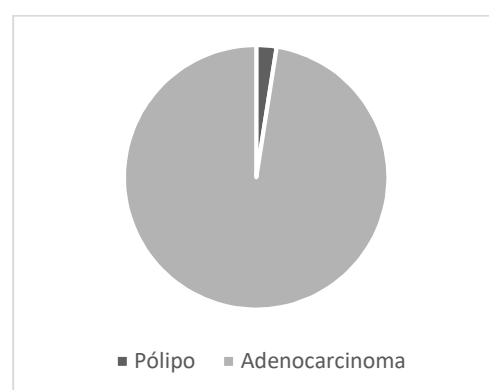


Figura 22. Resultado biopsia por colonoscopia.

El estadio preoperatorio se realizó mediante colonoscopia, TAC abdominopélvico, RM pelvis y/o ecografía endoanal. Se dividió según la última edición del 2016 del sistema TNM del AJCC y UICC (Tabla 11 y 12), pero dada la alta dispersión de los datos los agrupamos en dos grandes grupos, más y menos agresivos para poder realizar comparaciones entre ellos.

ESTADIO PREOPERATORIO cTNM	N	%
Pólipo	1	2
Estadio 0 (Tis N0)	0	0
Estadio I (T1-T2 N0)	7	17
Estadio IIA (T3 N0)	5	12
Estadio IIB (T4 N0)	1	3
Estadio IIIA (T1-T2 N1)	0	0
Estadio IIIB (T3-T4 N1)	13	33
Estadio IIIC (T1-T4 N2)	9	23
Estadio IV (T1-4 N1-2 M1)	4	10

Tabla 11. División por estadios según la última versión del 2016 del sistema TNM de la AJCC y UICC.

ESTADIO PREOPERATORIO 2 grupos	N	%
Menos agresivo	14	35
Más agresivo	26	65

Tabla 12. División de los estadios en dos grandes grupos.

Previamente a la cirugía, 27 (67.5%) pacientes recibieron neoadyuvancia y 13 (32.5%) no la recibieron (Figura 23). El tratamiento neoadyuvante consistió en radioterapia más capecitabina.

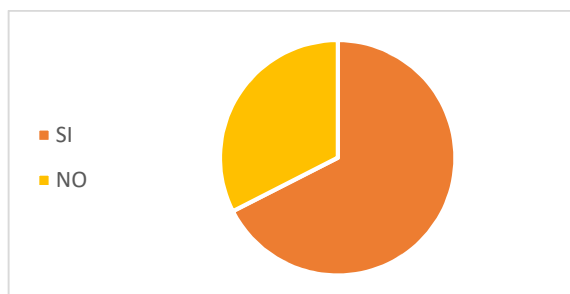


Figura 23. Distribución según administración de neoadyuvancia.

La intervención quirúrgica realizada se dividió en tres grupos, resección anterior baja o ultrabaja (RAB/RAUB) en 31 pacientes (77.5%), amputación abdominoperineal (AAP) en 6 pacientes (15%) y otras (panproctocolectomía, TEM y TAMIS) en 3 pacientes (7.5%) (Figura 24).

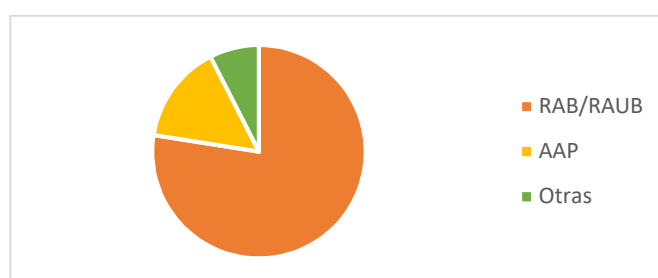


Figura 24. Distribución por intervenciones quirúrgicas.

Respecto al estadio posoperatorio, basado en el estudio anatomopatológico de la pieza, lo clasificamos en los estadios según la última clasificación TNM y los agrupamos igualmente en dos grupos, más y menos agresivos (tablas 13 y 14).

ESTADIO POSOPERATORIO ypTNM/pTNM	N	%
Pólipo	1	2.5
Estadio 0 (Tis N0): RC	6	15
Estadio I (T1-T2 N0)	10	25
Estadio IIA (T3 N0)	7	17.5
Estadio IIB (T4 N0)	2	5
Estadio IIIA (T1-T2 N1)	0	0
Estadio IIIB (T3-T4 N1)	7	17.5
Estadio IIIC (T1-T4 N2)	2	5
Estadio IV (T1-4 N1-2 M1)	5	12.5

Tabla 13. División por estadios según la última versión del 2016 del sistema TNM de la AJCC y UICC.

ESTADIO POSPERATORIO 2 grupos	N	%
Menos agresivo	26	65
Más agresivo	14	35

Tabla 14. División de los estadios en dos grandes grupos.

La adyuvancia o tratamiento posoperatorio con QT fue administrado en 28 pacientes (70%) y los 12 restantes (30%) no la recibieron (Figura 25) por los motivos descritos en la tabla 15. El tratamiento adyuvante administrado fue el esquema XELOX (Oxaliplatino-Capecitabina).

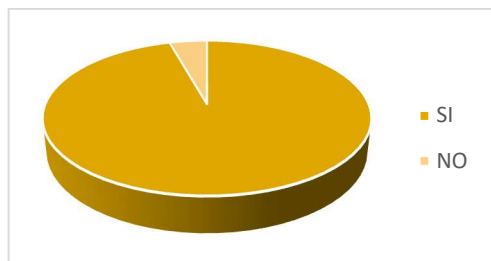


Figura 25. Distribución de la administración de adyuvancia.

MOTIVO NO ADYUVANCIA	N	%
Pólipo	1	25
Características favorables del tumor (ypTNM)		
Estadio 0	1	2.5
Estadio I	5	12.5
Estadio IIA	1	2.5
Mal estado general (no indicada por Oncología)	2	5
Rechazo del paciente	2	5
Total	12	30

Tabla 15. Motivos por los cuales los pacientes no recibieron adyuvancia.

Respecto a las variables de recidiva local o recidiva en otra localización del colon, tan sólo encontramos un caso de cada una por lo que no pudimos contrastar su relación con otras variables.

Respecto a la aparición de metástasis como variable de diseminación tumoral, 8 pacientes (20%) tuvieron metástasis y 32 pacientes (80%) no las tuvieron (Figura 26). De los 8 pacientes con metástasis, 5 de ellos las tuvieron de forma sincrónica, previas a la cirugía y 3

pacientes de forma metacrónica, en un paciente apareció a los 6 meses y en los 2 restantes a los 9 meses. La localización por orden de frecuencia fue pulmonar en 3 pacientes, hepática en 2 pacientes, ganglionar en uno y dos pacientes tuvieron metástasis en más de dos localizaciones (Figura 27). En la tabla 16 se resumen las características recogidas de la variable metástasis.

CARACTERÍSTICAS VARIABLE METÁSTASIS	N	%
No	32	80
Si	8	20
Localización:		
Sin metástasis	32	80
Pulmonar	3	7.5
Hepática	2	5
Ganglionar	1	2.5
Más de 2 localizaciones	2	5
Momento de aparición respecto cirugía:		
Sin metástasis	32	80
Previas	5	12.5
A los 6 meses	1	2.5
A los 9 meses	2	5

Tabla 16. Características de la variable de seguimiento metástasis.

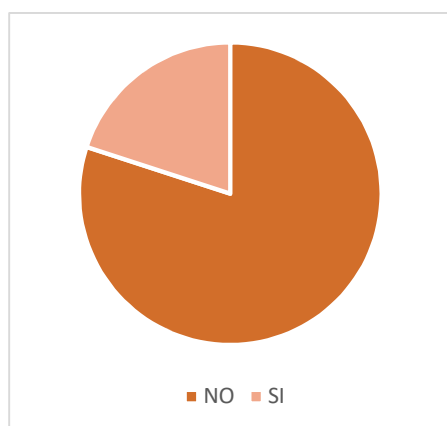


Figura 26. Distribución de aparición de metástasis.

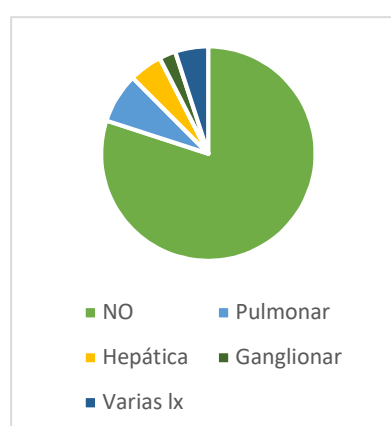


Figura 27. Distribución de su localización de las metástasis.

En el momento en el cual dimos por finalizado el seguimiento, la mayoría de los pacientes sobrevivían, 36 pacientes (90%) frente a 4 pacientes (4%) que fallecieron durante este período de tiempo. En la tabla 17 se señala el motivo y el mes desde de la cirugía de los pacientes fallecidos.

PACIENTE	MES DE EXITUS DESDE LA CIRUGÍA	CAUSA
1	4	Neumonía por SAMS (<i>Staphylococcus aureus</i> metilino sensible)
2	5	Desconocida
3	9	Progresión enfermedad
4	14	Progresión enfermedad

Tabla 17. Motivo y mes de exitus de los pacientes fallecidos.

2.2 Análisis descriptivo de las variables moleculares

2.2.1 Expresión de RNA de Endoglin y VEGF (criomoldes)

Debido a los problemas explicados previamente tan sólo conseguimos obtener 5 muestras de tejido tumoral para poder analizar la expresión génica de VEGF y Eng por inmunohistofluorescencia (IHF). Los criomoldes se analizan por PCR cuantitativa, y para cuantificar los valores se usa como valor de la parte no tumoral o control el valor 1. En la tabla 18 se describen los niveles obtenidos, así como alguna de las características de los pacientes.

N	1	2	3	4	5	Media
VEGF	14,83	7,02	2,35	3,54	0,66	5,68
ENG	4,02	1,38	1,37	0,50	0,77	1,61
LOCALIZACIÓN	Bajo	Alto	Alto	Alto	Alto	
ESTADIO ypTNM	IIIB	I	I	IIIB	IIA	
NEOADYUVANCIA	Si	No	No	No	No	
METÁSTASIS	No	No	No	Si	No	

Tabla 18. Resumen de los criomoldes obtenidos en cáncer de recto.

El único paciente registrado con cáncer de recto medio/inferior expresa unos niveles que duplican, como mínimo, los valores expresados en los localizados en recto alto, sin poder llegar a ninguna relación significativa dado el tamaño muestral.

Sin llegar a ser ninguno de los dos marcadores significativos, el VEGF se aproxima en mayor medida a la significación estadística respecto a la Eng como se muestra en la tabla 19, sobre todo al transformar las variables logarítmicamente.

	VARIABLE NORMAL		VARIABLE TRANSFORMADA	
	Media	p	Media	p
ENG	1.61	0.38	0.22	0.26
VEGF	5.68	0.13	1.27	0.0.72

Tabla 19. Análisis estadístico de los valores obtenidos en la expresión génica.

2.2.2. Niveles de proteína soluble de Endoglina y VEGF en plasma

En el preoperatorio o momento 0 es en el cuál más muestras de plasma pudimos obtener, en el seguimiento fue aumentando el número de pacientes perdidos. En la tabla 20 y 21 mostramos los valores mínimos y máximos, así como los valores medios en cada uno de los momentos para poder observar su evolución a lo largo del tiempo (Figura 28).

Posteriormente hemos contrastado los niveles de Eng y VEGF con otras variables recogidas obteniendo algunas relaciones significativas que explicaremos más detenidamente.

ENG (ng/mL)		0m	3m	6m	9m
N	Válido	37	17	11	6
	Perdidos	3	23	29	34
Media		5,14	7,22	7,24	8,14
Mediana		4,63	6,11	6,87	9,82
Desviación estándar		1,97	3,89	3,25	3,08
Mínimo		1,29	2,85	3,25	3,91
Máximo		10,20	20,24	11,64	10,73

Tabla 20. Valores obtenidos en plasma de Eng.

VEGF (pg/mL)		0m	3m	6m	9m
N	Válido	38	18	11	6
	Perdidos	2	22	29	34
Media		63,92	44,24	39,61	45,27
Mediana		39,01	22,01	32,56	31,85
Desviación estándar		72,97	71,06	43,79	62,77
Mínimo		0	0	0	0
Máximo		334,96	290,51	131,25	168,57

Tabla 21. Valores obtenidos en plasma de VEGF.

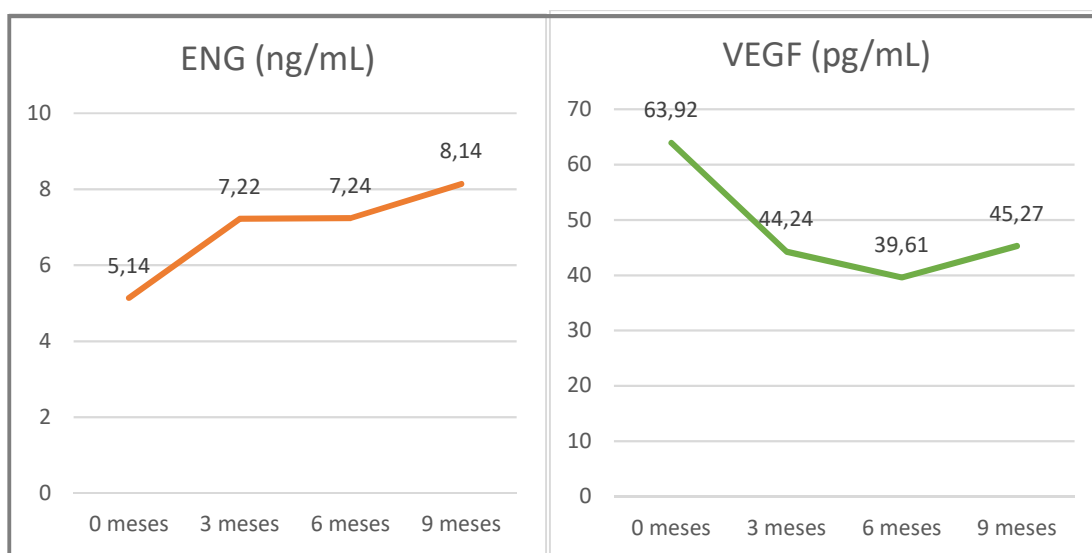


Figura 28. Evolución en el tiempo de los valores en plasma de Eng y VEGF.

2.2.3. Tinción por inmunohistoquímica de Endogлина (parafinas)

Respecto a las tinciones de IHQ, según el protocolo que hemos explicado previamente, hemos examinado 28 pacientes de los 40 totales. De cada uno de ellos se ha tomado una muestra de tejido tumoral y una de tejido no tumoral pero próximo a la zona tumoral, cada pareja de muestras (T y NT) se han incubado a la vez, por lo que hemos podido compararlas entre ellas.

Con la hematoxilina se tiñen en general los núcleos celulares, lo que da el aspecto morado-azulado a los tejidos. El anticuerpo de Endogлина se une a los tejidos, principalmente a la membrana de los túbulos y a la de los vasos sanguíneos, y se observa como una tinción marrón.

En algunas muestras no se ha obtenido una tinción clara debido a diversos factores a tener en cuenta como la extracción del tumor, el espesor de la muestra, el desparafinado, la concentración de anticuerpo usado y el tiempo de incubación entre otros.

Hemos observado cada pareja de muestras y las hemos relacionado según supuestas variables en las que podría tener un significado la Eng. No hemos encontrado una clara relación entre la tinción observada de Eng y el estadio tumoral según TNM, ni preoperatorio ni posoperatorio. Tampoco hemos conseguido ver relación entre la tinción por IHQ y su expresión génica, debido principalmente a la escasez de criomoldes obtenidos.

La relación que hemos logrado corroborar y explicar según las hipótesis ya escritas por otros autores sobre el funcionamiento de la Eng, es su paralelismo entre los niveles de Eng soluble en el momento de obtención de la muestra y Eng presente en los tejidos según su tinción por IHQ.

Comenzando por aquellos pacientes con niveles más bajos de solEng en el momento de extracción del tumor, valores comprendidos entre 1 y 5, observamos una tendencia general a una mayor expresión de Eng en zona no tumoral predominantemente en las membranas de los túbulos (flecha roja) y una expresión menor, pero presente, en el estroma de la zona tumoral (flecha amarilla).

Como ejemplo mostramos las siguientes muestras (Figuras 29-31):

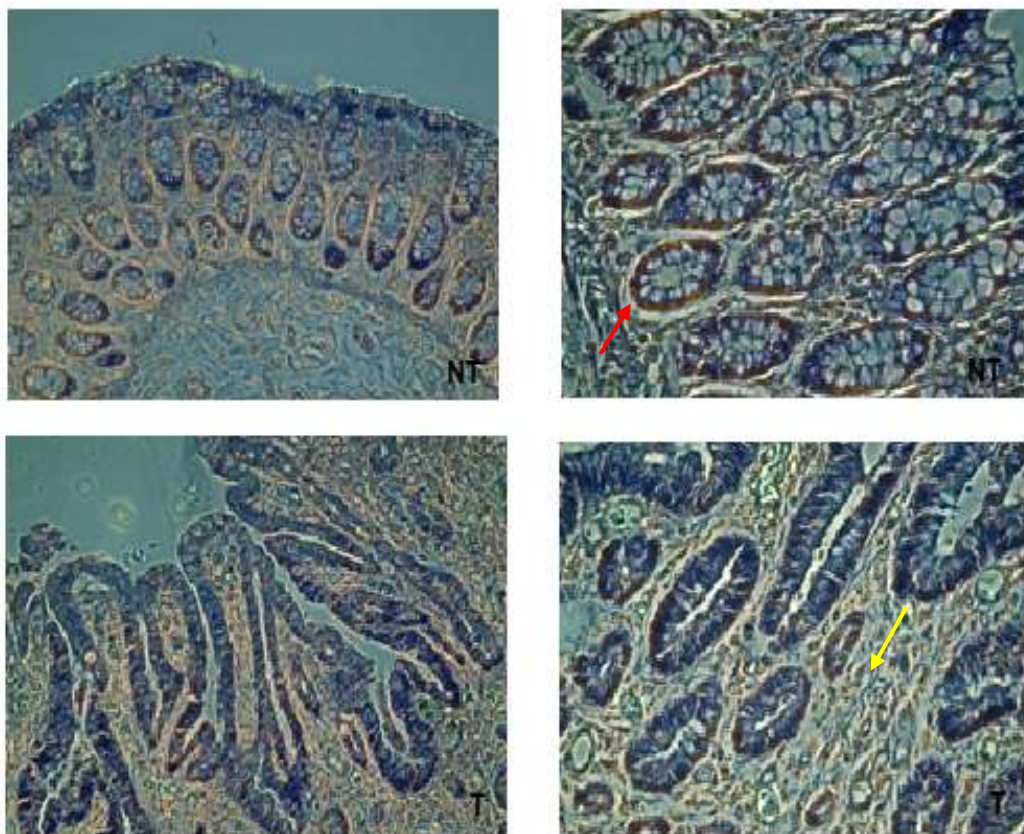


Figura 29. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha roja indica tinción específica en la membrana de los túbulos de la zona no tumoral. Flecha amarilla indica tinción específica en el estroma en zona tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 3.11

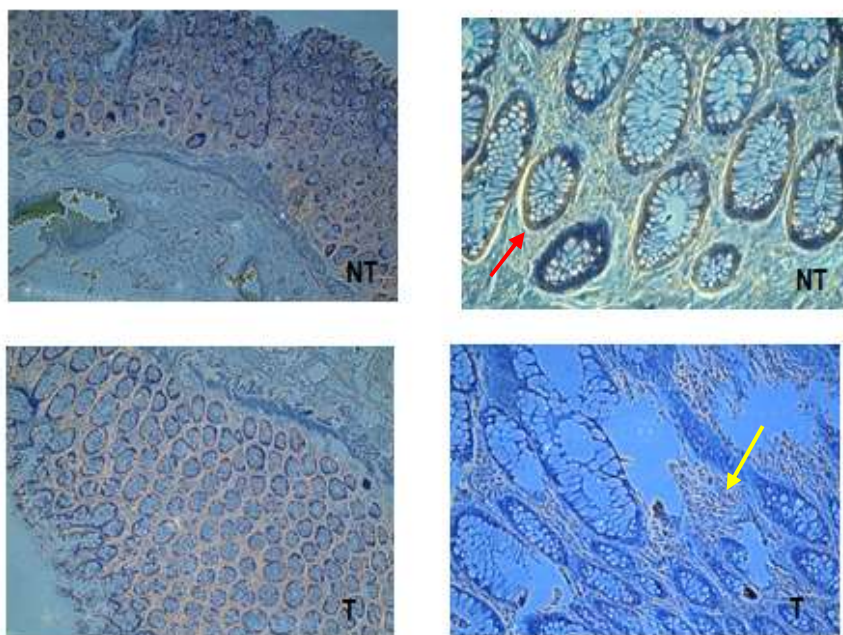


Figura 30. Inmunohistoquímica de Endoglin en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha roja indica tinción específica en la membrana de los túbulos de la zona no tumoral. Flecha amarilla indica tinción específica en el estroma en zona tumoral. Nivel de Endoglin soluble: 3.84

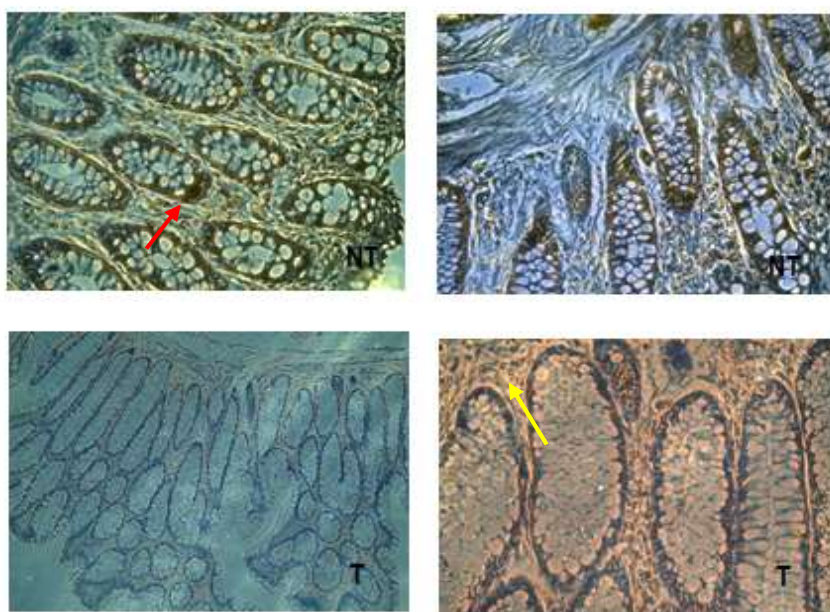


Figura 31. Inmunohistoquímica de Endoglin en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha roja indica tinción específica en la membrana de los túbulos de la zona no tumoral. Flecha amarilla indica tinción específica en el estroma en zona tumoral. Nivel de Endoglin soluble: 5.49

Existe un valor intermedio, entre 6 y 7, en el cual se continúa observando expresión de Eng, pero predomina a nivel del estroma (flecha amarilla) (Figuras 32-33).

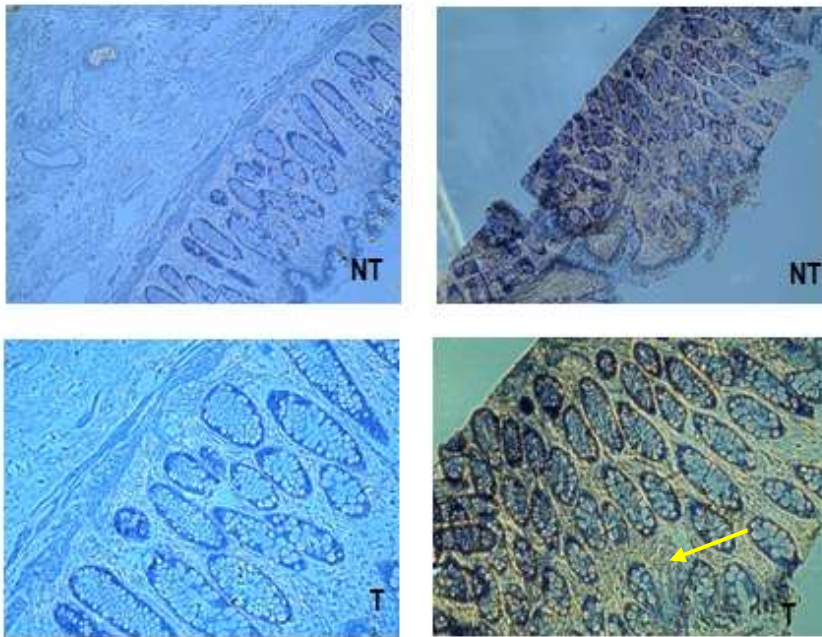


Figura 32. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha amarilla indica tinción específica en el estroma en zona tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 6.16

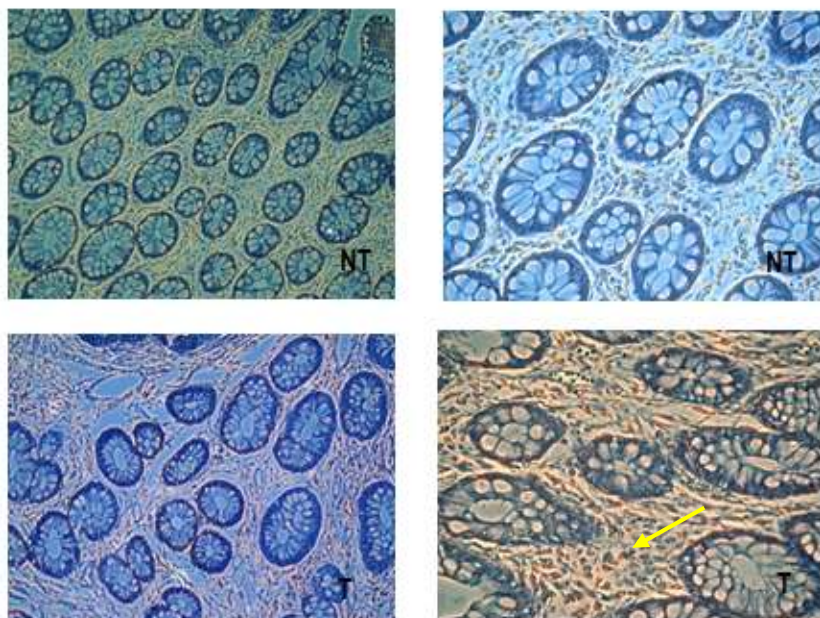


Figura 33. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha amarilla indica tinción específica en el estroma en zona tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 6.44

Por último, nos encontramos con aquellos pacientes con niveles altos de solEng, donde observamos una disminución de su expresión en los tejidos, al menos su tinción específica, tanto en zona tumoral como en no tumoral.

Como ejemplo mostramos tres muestras de los tres pacientes con niveles más altos de solEng registrados (Figuras 34-36).

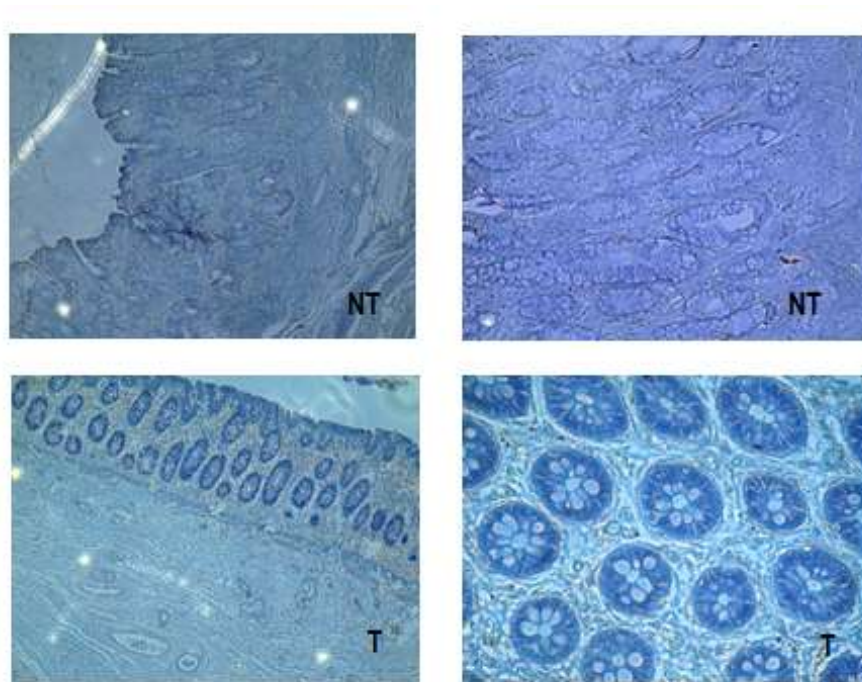


Figura 34. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Nivel de Endoglina soluble: 7.76

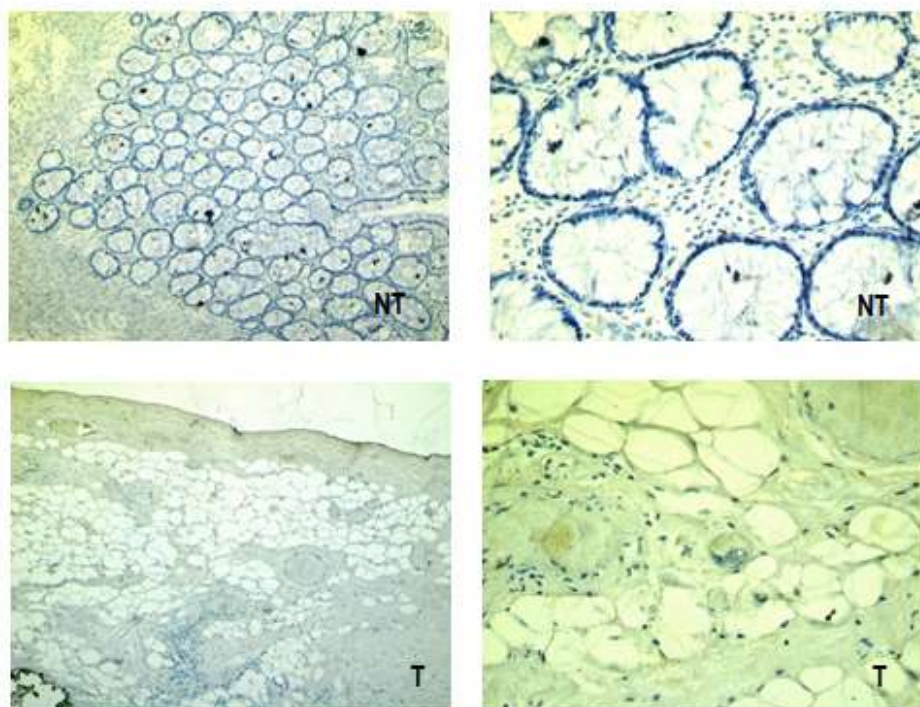


Figura 35. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Nivel de Endoglina soluble: 7.93

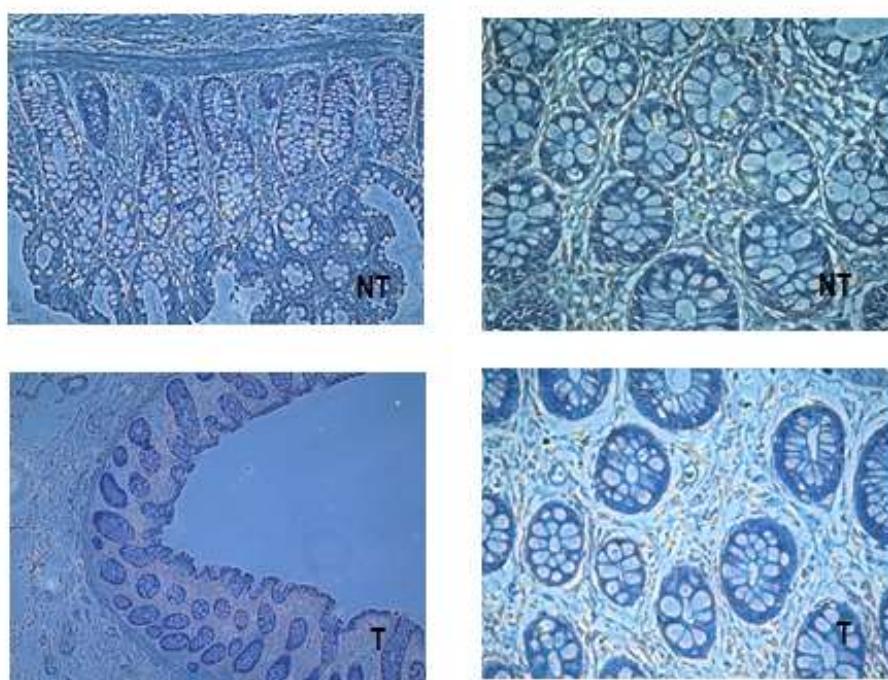


Figura 36. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de recto. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Nivel de Endoglina soluble: 8.04

2.3. Contraste de variables

La **edad**, el **sexo** y la **biopsia de la colonoscopia** son factores independientes, no hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre ellas.

Respecto a la **neoadyuvancia**, tal y como esperábamos, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas cuando la relacionamos con la localización del tumor y el estadio preoperatorio. El total de pacientes que recibieron neoadyuvancia (27 de 27, 100%) tenían el tumor de recto localizado en tercio medio o inferior, obvio porque los tumores localizados en recto superior no tienen indicación de neoadyuvancia en nuestro centro. De este grupo de pacientes que recibieron neoadyuvancia, el 81.5% (22 de 27) fueron tumores diagnosticados en estadios agresivos (estadios III y IV).

VARIABLES	NEOADYUVANCIA				Prueba Chi- Cuadrado
	N	SI %	NO N	%	
LOCALIZACIÓN					
Alto	0	0	13	100	p = 0
Medio/bajo	27	100	0	0	
ESTADIO (cTNM)					
Menos agresivo (0, I y II)	5	18.5	9	69.2	p = 0.04
Más agresivos (III y IV)	22	81.5	4	30.8	

Tabla 22. Neoadyuvancia vs localización y estadio preoperatorio.

Respecto al **estadio preoperatorio (cTNM)** hemos hallado que se relaciona de forma estadísticamente significativa con la localización y la neoadyuvancia, como ya hemos mencionado. No se ha encontrado relación estadísticamente significativa con la adyuvancia ni con la aparición de metástasis en ninguno de los momentos medidos.

Los estadios menos agresivos se localizan en recto alto en el 64.3% de los casos, el 69.2% no recibieron neoadyuvancia y el 50% no recibieron adyuvancia. En los estadios más agresivos observamos que el 84.6% se localizan en recto medio e inferior, el 81.5% recibió neoadyuvancia y el 80.8% recibió adyuvancia.

VARIABLES	cTNM modificado				Prueba Chi-Cuadrado
	Menos agresivo (0, I y II)		Más agresivo (III y IV)		
	N	%	N	%	
LOCALIZACIÓN					p = 0.04
Alto	9	64.3	4	15.4	
Medio/bajo	5	35.7	22	84.6	
NEOADYUVANCIA					p = 0.04
Si	5	18.5	22	81.5	
No	9	69.2	4	30.2	

Tabla 23. Estadio preoperatorio vs localización y neoadyuvancia.

VARIABLES	cTNM modificado				Prueba Chi-Cuadrado
	Menos agresivo (0, I y II)		Más agresivo (III y IV)		
	N	%	N	%	
ADYUVANCIA					$p = 0.071$
Si	7	50	21	5	
No	7	50	80.8	19.2	
METÁSTASIS 0					$p = 0.143$
Si	0	0	5	19.2	
No	1	100	21	80.8	
METÁSTASIS 3					$p = 0.143$
Si	0	0	5	19.2	
No	14	100	21	80.8	
METÁSTASIS 6					$p = 0.074$
Si	0	0	6	23.1	
No	14	100	20	76.9	
METÁSTASIS 9					$p = 0.689$
Si	2	14.3	6	23.1	
No	12	85.7	20	76.9	

Tabla 24. Estadio preoperatorio vs adyuvancia y metástasis.

Analizando la variable **estadio postoperatorio (pTNM)**, divididos igualmente en estadios más y menos agresivos, encontramos relación estadísticamente significativa con la existencia de metástasis (sincrónicas y metacrónicas) y más de una localización. Como muestra la tabla 25, los estadios más agresivos se relacionan con un mayor porcentaje de metástasis y en más de una localización.

VARIABLES	ypTNM modificado				Prueba Cuadrado	Chi-
	Menos agresivo (0, I y II)		Más agresivo (III y IV)			
	N	%	N	%		
METÁSTASIS						
Si	1	4	7	50	p <0.05	
No	25	96	7	50		
Nº METÁSTASIS						
0	25	96	7	50	p <0.05	
1	1	4	5	35.77		
3	0	0	2	14.3		

Tabla 25. Estadio postoperatorio vs metástasis.

En el análisis de las variables moleculares en el recto nos hemos encontrado con dos problemas que no hemos tenido con las muestras de colon. En primer lugar, el número de muestras ha sido menor, concretamente en el caso de los criomoldes únicamente obtuvimos 5 por lo que no pudimos realizar un análisis estadístico. En segundo lugar, hemos observado que el tratamiento neoadyuvante que recibieron gran parte de los pacientes con cáncer de recto ha modificado los datos esperados, hecho que nos pasó desapercibido hasta la obtención de los mismos.

Con esta reflexión podemos concluir que los datos son insuficientes para definir como marcadores tumorales a Eng o a VEGF. De todas formas, añadimos a continuación el análisis estadístico realizado y la tendencia observada en las variables moleculares medidas en plasma.

Respecto a los **niveles de proteína soluble** en plasma hemos contrastado las situaciones que exponemos a continuación.

2.3.1. Relación entre el estadio preoperatorio (cTNM modificado) y niveles preoperatorios comparado con sujetos sanos

Hemos comparado los niveles en el momento 0 o preoperatorios con niveles control en sujetos sanos y para ello debemos previamente realizar algunas aclaraciones.

El valor normal de VEGF en sujetos sanos se considera menor de 50 pg/ml según el protocolo de Human VEGF Quantikine ELISA Kit, valores iguales o superiores han sido considerado positivos tumorales. Respecto a la Endogлина soluble, en el estudio realizado por el equipo de la Dra. Luisa Botella (Fernández L. et al, 2006), los niveles control eran de entre 3.5-4.5 analizados con el kit R&D, pero debido a una serie de problemas con los valores obtenidos se decidió cambiar de kit. En este estudio hemos analizado las muestras con el kit de un solo paso que da un punto menos a la solEng que los de R&D. Por este motivo hemos considerado los valores normales los menores a 3.5ng/ml y los positivos tumorales los iguales o superiores a 3.5ng/ml.

▪ Endogлина

Los valores por encima de 3.5ng/ml, considerados positivos tumorales fueron en los estadios menos agresivos del 83.3% del total de estos casos y en los estadios más agresivos una cifra similar, el 84% del total de tumores agresivos. Un total de 83.8% de pacientes con cáncer de recto tuvieron niveles más elevados de Eng comparados con sujetos sanos. No se encontró significación estadística en esta relación de variables.

cTNM modificado	Niveles de Eng en plasma	
	< 3.5	≥ 3.5
Menos agresivo	16.7%	83.3%
Más agresivo	16%	84%
Total	16.2%	83.8%

Tabla 26. Niveles de Eng en plasma en momento 0 según cTNM modificado.

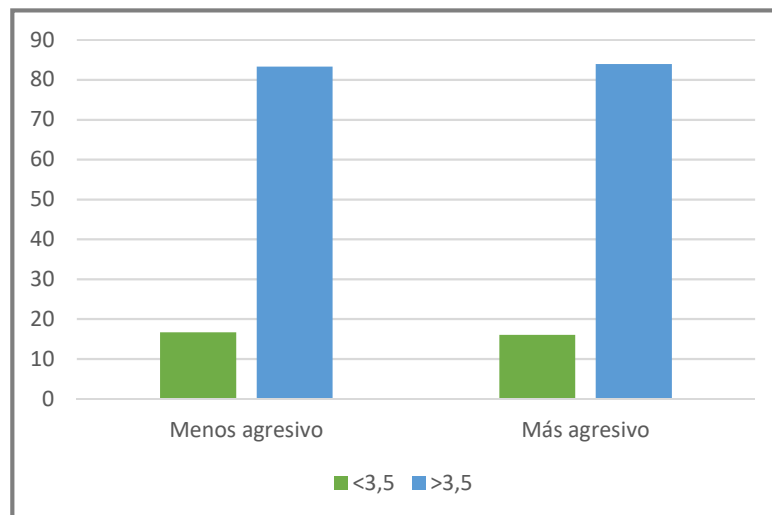


Figura 37. Gráfico de porcentajes cTNM modificado versus nivel de Eng.

▪ **VEGF**

Los estadios más agresivos tuvieron un nivel preoperatorio superior a 50 pg/ml en el 46.2% de los casos frente a los estadios menos agresivos que lo tuvieron un 41.7% de los casos. Del total de pacientes con cáncer de recto, más de la mitad tuvo niveles considerados normales de VEGF en el momento 0 y un 44.7% tuvieron niveles superiores considerados patológicos. Igualmente, no encontramos entre estas variables una relación estadísticamente significativa.

cTNM modificado	Niveles de VEGF en plasma	
	< 50	≥ 50
Menos agresivo	58.3%	41.7%
Más agresivo	53.8%	46.2%
Total	55.3%	44.7%

Tabla 27. Niveles de VEGF en plasma en momento 0 según cTNM modificado.

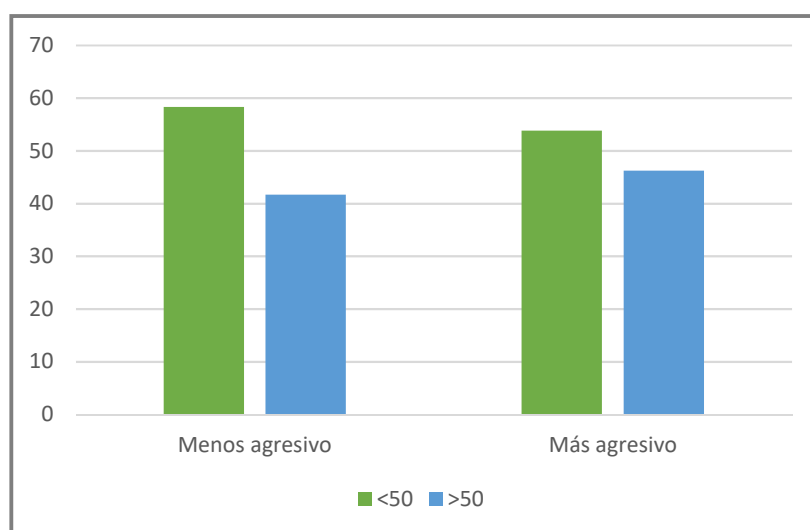


Figura 38. Gráfico de porcentajes cTNM modificado versus nivel de VEGF.

2.3.2. Relación entre estadio preoperatorio (cTNM modificado) y evolución de los niveles en plasma en el tiempo

Hemos relacionado los niveles de proteína soluble y el estadio cTNM modificado con el objetivo de comparar su evolución en el tiempo según la naturaleza del tumor. En la tabla 28 se muestran las medias de estos valores.

TIEMPO	cTNM modificado	ENG (ng/mL)			VEGF (pg/mL)		
		N	Media	Desviación estándar	N	Media	Desviación estándar
0 meses	Menos agresivo	12	4,70	1,60	12	79,83	103,08
	Más agresivo	25	5,35	2,13	26	56,58	55,03
3 meses	Menos agresivo	6	8,89	5,88	5	46,08	54,28
	Más agresivo	11	6,32	2,08	13	43,54	78,54
6 meses	Menos agresivo	5	8,33	4,16	5	22,21	34,47
	Más agresivo	6	6,32	2,26	6	54,12	48,26
9 meses	Menos agresivo	1	9,59		1	0,00	
	Más agresivo	5	7,85	3,35	5	54,33	65,65

Tabla 28. Relación cTNM modificado con niveles de plasma en los distintos momentos.

▪ Endoglina

A pesar de que en el momento 0 los niveles de los tumores más agresivos son ligeramente más elevados, en la evolución se observa que los niveles de aquellos tumores menos agresivos alcanzan niveles más altos. Esta relación no ha sido estadísticamente significativa ($p>0.05$).

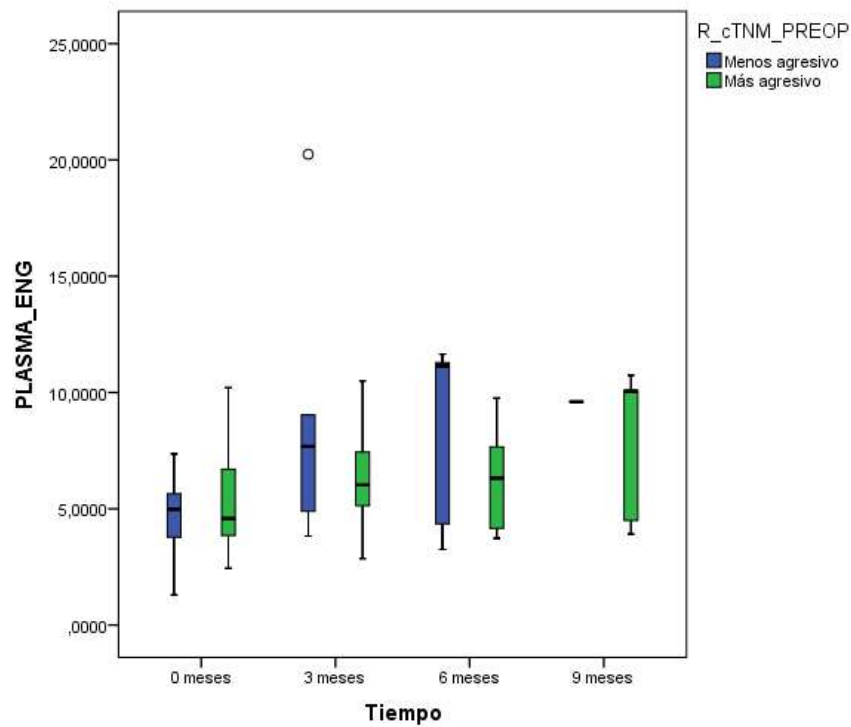


Figura 39. Evolución de la Eng según estadio cTNM modificado. El eje de ordenadas representa el nivel en plasma de solEng, el eje de abscisas el mes en el que se obtuvo la muestra, el mes 0 corresponde al preoperatorio. Las cajas azules representan los tumores menos agresivos y las cajas verdes los más agresivos.

▪ VEGF

Tras la intervención quirúrgica se observa una disminución paulatina de los niveles en aquellos tumores diagnosticados desde un principio como menos agresivos, a diferencia de los tumores más agresivos que permanecen con cifras superiores a los sujetos sanos, sin normalizarse a lo largo del tiempo. Esta relación tampoco ha resultado ser estadísticamente significativa ($p>0.05$).

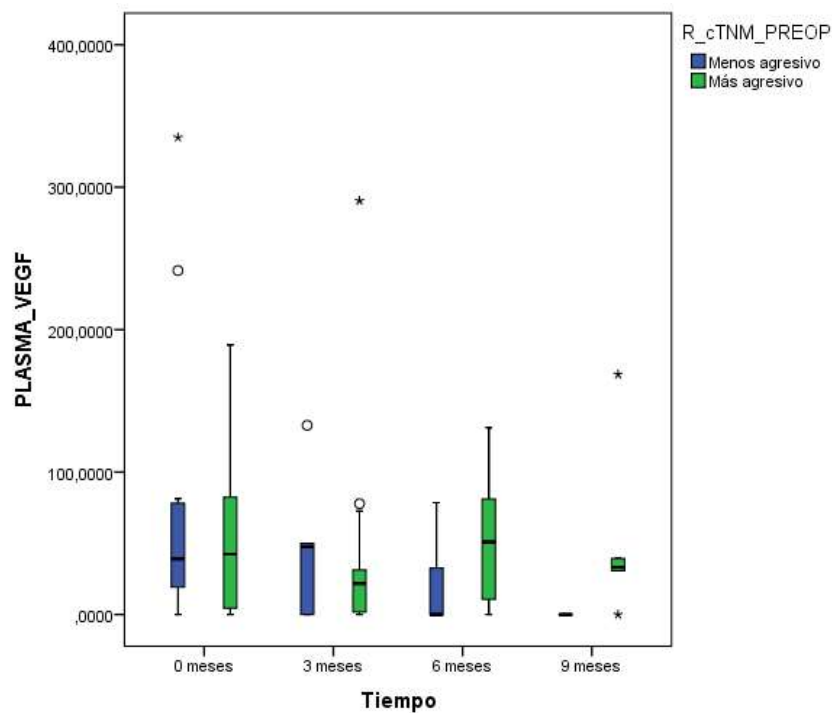


Figura 40. Evolución de la VEGF según estadio cTNM modificado. El eje de ordenadas representa el nivel en plasma de VEGF, el eje de abscisas el mes en el que se obtuvo la muestra, el mes 0 corresponde al preoperatorio. Las cajas azules representan los tumores menos agresivos y las cajas verdes los más agresivos.

2.3.3. Relación entre la evolución de los niveles solubles en plasma y metástasis

Hemos relacionado los valores obtenidos en plasma en los distintos momentos y la existencia o no de metástasis. En la tabla 29 se expone el tamaño muestral de cada momento y situación, así como la media obtenida.

TIEMPO	Metástasis	ENG (ng/mL)			VEGF (pg/mL)		
		N	Media	Desviación estándar	N	Media	Desviación estándar
0 meses	No	32	4,70	1,62	33	63,95	73,71
	Si	5	7,91	1,90	5	63,76	76,11
3 meses	No	16	7,19	4,01	16	45,13	74,48
	Si	1	7,77		2	37,15	50,16
6 meses	No	10	7,19	3,42	10	42,51	45,03
	Si	1	7,66		1	10,67	
9 meses	No	6	8,14	3,08	6	45,27	62,77
	Si	0					

Tabla 29. Valores de Eng y VEG en plasma vs metástasis y tiempo.

▪ Endogлина

En el momento 0, valor más fiable del que disponemos por tener un mayor tamaño muestral, los pacientes con metástasis parten de un nivel claramente más elevado (7.91 vs 4.70) con una relación estadísticamente significativa ($p=0.008$). A los 3 y a los 6 meses los niveles parecen equipararse, aunque siguen persistiendo más elevados en los pacientes con metástasis con una relación estadísticamente significativa ($p=0.021$).

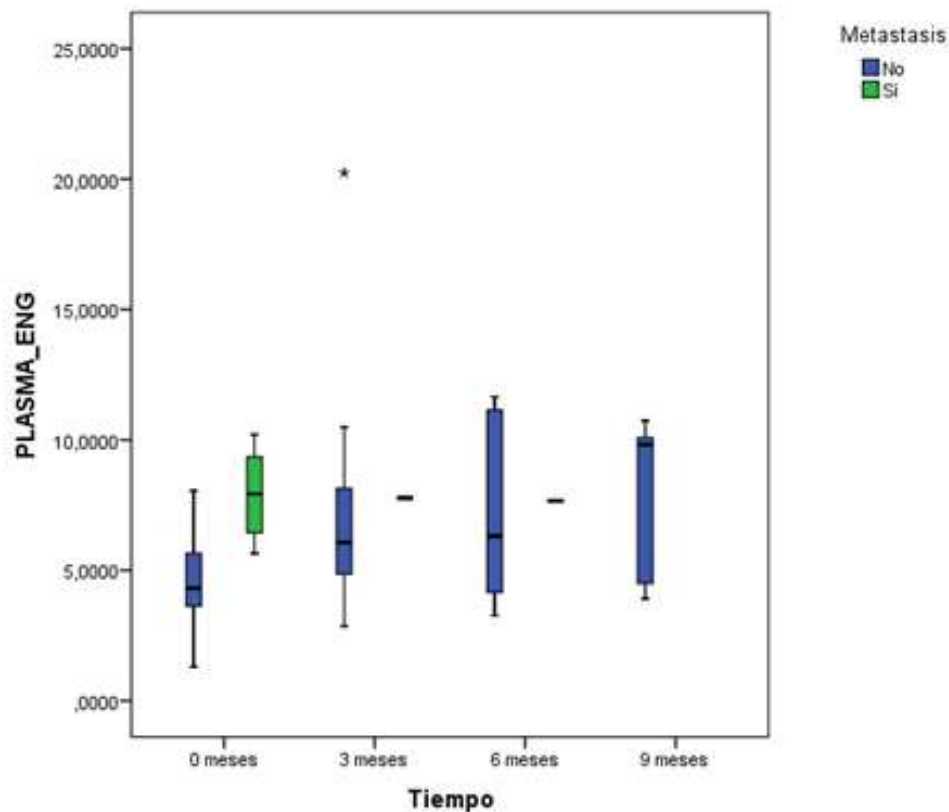


Figura 41. Evolución de la Eng según la existencia de metástasis. En el eje de ordenadas se representa el nivel de solEng, en el eje de abscisas el mes en el que se obtuvo la muestra, el mes 0 corresponde al preoperatorio. Las cajas azules representan los pacientes con metástasis y las cajas verdes los pacientes sin metástasis.

▪ VEGF

En el caso del VEGF observamos que ambos grupos de pacientes parten de un nivel similar y ambos van disminuyendo sus niveles a los 3 y a los 6 meses, con un descenso más acusado en aquellos pacientes con metástasis. El tamaño muestral ha sido insuficiente y ninguna de estas relaciones ha resultado estadísticamente significativa ($p=0.36$ y $p=0.46$, respectivamente).

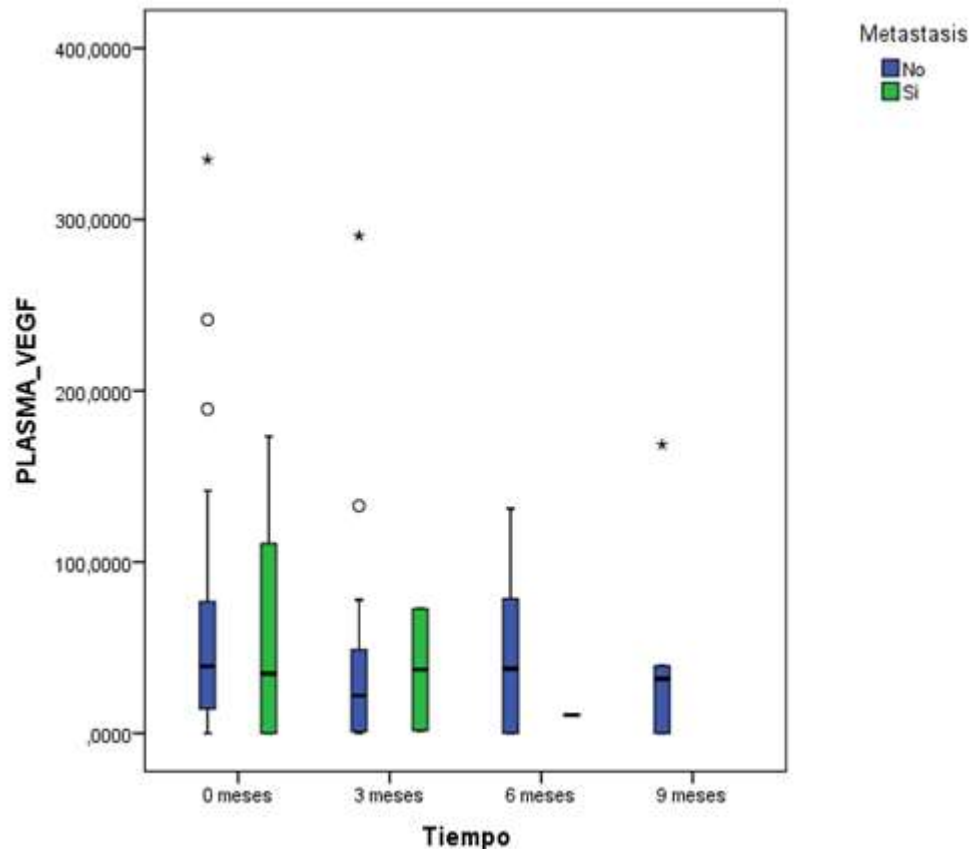


Figura 42. Evolución del VEGF según la existencia de metástasis. Evolución de la VEGF según la existencia de metástasis. En el eje de ordenadas se representa el nivel de VEGF, en el eje de abscisas el mes en el que se obtuvo la muestra, el mes 0 corresponde al preoperatorio. Las cajas azules representan los pacientes con metástasis y las cajas verdes los pacientes sin metástasis.

3. GRUPO CÁNCER DE COLON

3.1. Análisis descriptivo de las variables clínicas y anatomopatológicas:

Nuestro estudio se ha realizado en un grupo de 93 pacientes diagnosticados de cáncer de colon, de los cuales 58 eran varones (62.4%) y 35 mujeres (37.6%) (Figura 43). La edad fue de más de 65 años en 69 pacientes (74.2%), frente a 24 pacientes (25.8%) que tenían menos de 65 años en el momento de ser incluidos en el estudio (Figura 44).

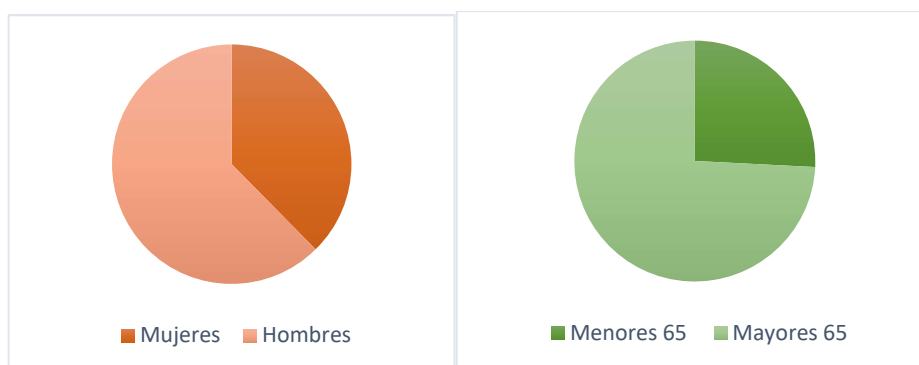


Figura 43. Distribución por sexo.

Figura 44. Distribución por edad.

Respecto a la localización tumoral en 40 pacientes se localizó en sigma (43%), en 31 pacientes en colon derecho (33.3%), en 13 pacientes en colon izquierdo (14%), en 8 pacientes en colon transversal (8.6%) y tan sólo un paciente tuvo un tumor sincrónico (1.1%) (Figura 45).

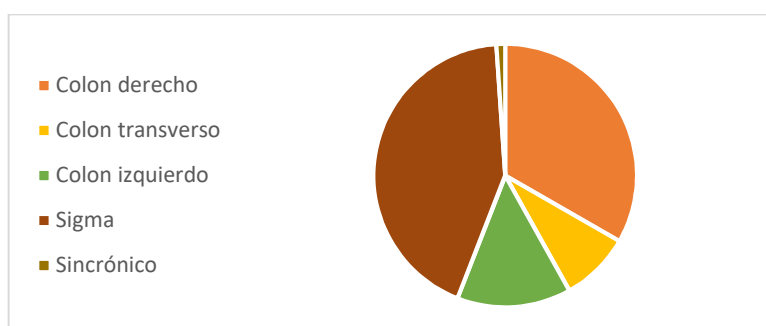


Figura 45. Localización del tumor.

Las biopsias tomadas en el momento de la colonoscopia registraron un total de 76 adenocarcinomas (81.7%) y 17 pólipos (18.3%) adenomatovillosos, vellosos o adenomatosos con degeneración carcinoide (Figura 46).

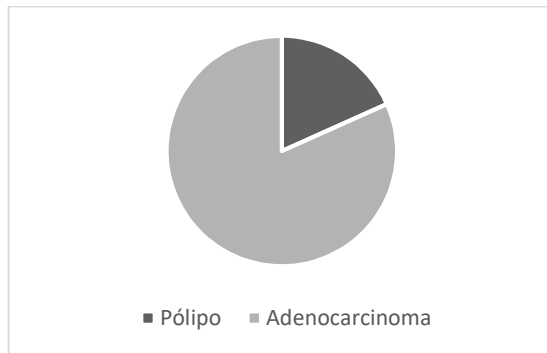


Figura 46. Resultado biopsia por colonoscopia.

Las intervenciones quirúrgicas realizadas fueron las siguientes por orden de frecuencia: 32 hemicolectomías derechas (34.4%), 32 sigmoidectomías (34.4%), 12 hemicolectomías izquierdas (12.9%), 5 colectomías subtotales (5.4%), 4 resecciones segmentarias (4.3%), 3 RAA (resección anterior alta) (3.2%) y en 5 pacientes se realizaron otro tipo de cirugías (en 4 pacientes se realizó una operación de Hartmann y en un paciente una hemicolectomía derecha más resección intestinal) (Figura 47).

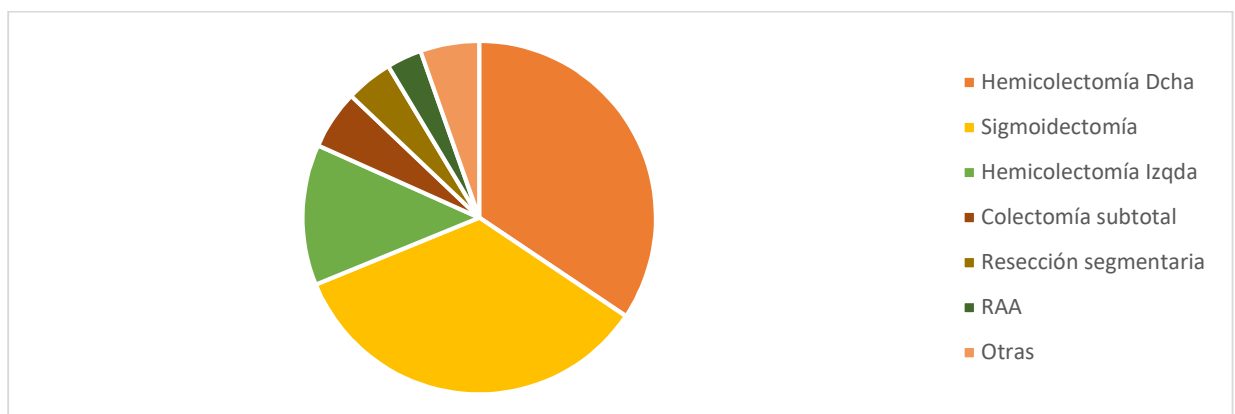


Figura 47. Distribución por intervenciones quirúrgicas.

El estadiaje se realizó según la última edición del 2016 del sistema TNM del AJCC y UICC (tabla 30 y figura 48), pero para una mejor comparación entre aquellos estadios de mejor y peor pronóstico se dividieron en dos grandes grupos, más y menos agresivos (tabla 31 y figura 49). El estadiaje se basó en el análisis anatomopatológico de la pieza una vez extraída más los datos aportados por las pruebas preoperatorios sobre la existencia de metástasis.

ESTADIO POSOPERATORIO pTNM	N	%
Pólipo	5	5.4
Estadio 0 (Tis N0)	4	4.3
Estadio I (T1-T2 N0)	14	15.1
Estadio IIA (T3 N0)	23	24.7
Estadio IIB (T4 N0)	10	10.8
Estadio IIIA (T1-T2 N1)	2	2.2
Estadio IIIB (T3-T4 N1)	16	17.2
Estadio IIIC (T1-T4 N2)	9	7.5
Estadio IV (T1-4 N1-2 M1)	4	12.9

Tabla 30. División por estadios según la última versión del 2016 del sistema TNM de la AJCC y UICC.

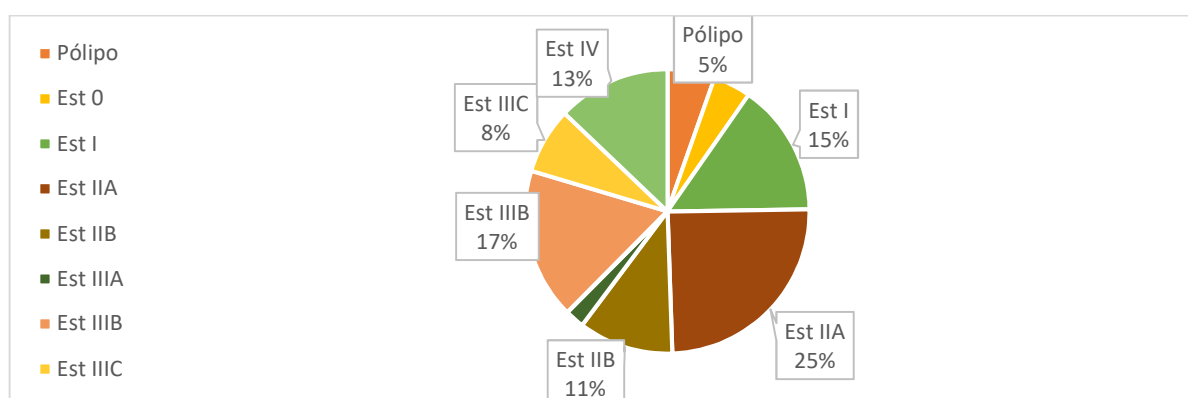


Figura 48. Distribución según estadios.

ESTADIO POSPERATORIO 2 grupos	N	%
Menos agresivo	56	60.2
Más agresivo	37	39.8

Tabla 31. División de los estadios en dos grandes grupos.

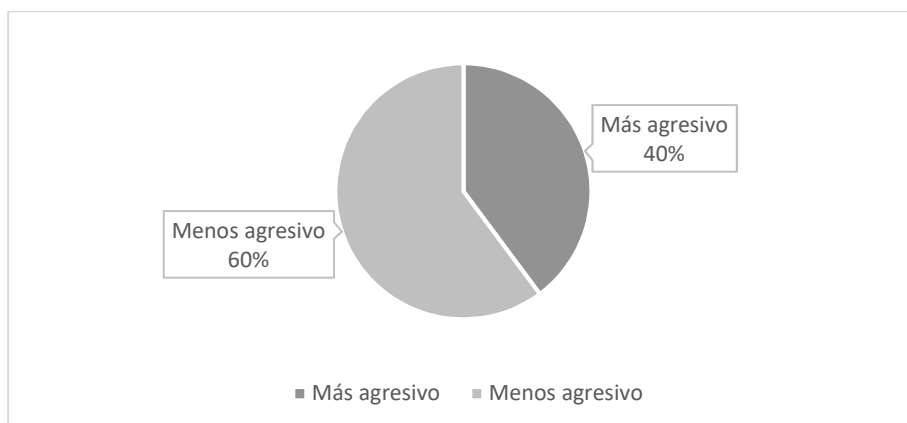


Figura 49. Distribución según estadios.

El tratamiento adyuvante fue administrado en 42 pacientes (45.2%) según el esquema XELOX (Oxaliplatino-Capecitabina). Los restantes 51 pacientes (54.8%) no recibieron tratamiento posoperatorio por los motivos que indicamos en la tabla 32.

MOTIVO NO ADYUVANCIA	N	%
No indicación por características favorables del tumor	40	43
Mal estado general (no indicada por Oncología)	7	7.5
Rechazo del paciente	2	2.15
Exitus	2	2.15
Total	51	54.8

Tabla 32. Motivos por los cuales los pacientes no recibieron adyuvancia.

Respecto a la variable recidiva, al igual que en el grupo de cáncer de recto, tan sólo contamos con dos casos por lo que no hemos podido contrastarla con otras variables.

Respecto a la variable metástasis como variable de diseminación hemos recogido su momento de aparición y su localización. De los 93 pacientes incluidos en el estudio, 72 no presentaron metástasis (77.4%), frente a 21 pacientes (22.6%) que si las presentaron en algún momento del estudio (Figura 50). De los 21 pacientes que presentaron metástasis, 12 (57.15%) las presentaron de forma sincrónica, diagnosticadas previas a la cirugía. Los 9 pacientes restantes (42.86%) las presentaron de forma metacrónica, 3 pacientes en los siguientes 3 meses, un paciente a los 6 meses, otro a los 9 meses y cuatro pacientes pasados los 9 meses, a los 11, 18, 19 y 24 meses respectivamente.

La localización por orden de frecuencia fue hepática en 14 pacientes (15.1%), pulmonar en 2 pacientes (2.2%), ganglionar en uno (1.1%) y cuatro pacientes (4.3%) tuvieron metástasis en otras localizaciones (Figura 51). Tres pacientes presentaron metástasis en más de dos localizaciones y dos en más de tres localizaciones. En la tabla 33 resumimos las características recogidas de la variable metástasis.

CARACTERÍSTICAS VARIABLE METÁSTASIS	FRECUENCIA	
	N	%
No	72	77.4
Si	21	22.6
Localización:		
Sin metástasis	72	77.4
Hepática	14	15.1
Pulmonar	2	2.1
Ganglionar	1	1.1
Otras localizaciones	4	4.3
Momento de aparición respecto cirugía:		
Sin metástasis	72	77.4
En el momento 0 o previas	12	12.9
A los 3 meses	3	3.2
A los 6 meses	1	1.1
A los 9 meses	1	1.1
Más de 9 meses	4	4.3

Tabla 33. Características de la variable de seguimiento metástasis.

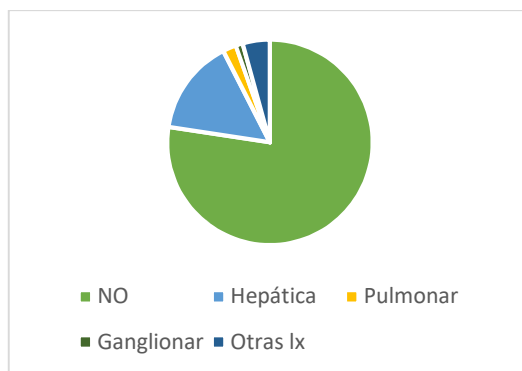
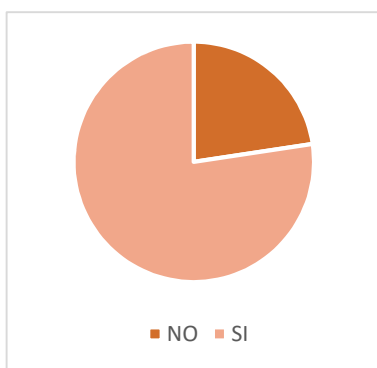


Figura 50. Distribución de aparición de metástasis. **Figura 51.** Distribución de la localización de las metástasis.

El 94.6% de los pacientes permanecían vivos al final del seguimiento y un 5.4% de pacientes habían fallecido. El mes y la causa del exitus se detallan en la tabla 34.

PACIENTE	MES DE EXITUS DESDE LA CIRUGÍA	CAUSA
1	1	Progresión enfermedad
2	8	Tumor de vejiga
3	2	Tumor carcinoide pulmonar
4	3	Progresión enfermedad
5	2	TEP

Tabla 34. Motivo y mes de exitus de los pacientes fallecidos.

3.2. Análisis descriptivo de las variables moleculares

3.2.1. Expresión de RNA de Endoglina y VEGF (criomoldes)

De los 93 pacientes con cáncer de colon se obtuvieron 42 muestras para analizar la expresión génica de Eng y 43 de VEGF. Hubo un total de 50 y 51 pacientes respectivamente que no pudimos obtener criomolde. De nuevo la expresión génica en el tejido tumoral se compara con un valor control de 1 correspondiente a tejido no tumoral.

A continuación, exponemos en la tabla 35 los valores medios de RNA de Eng y VEGF medidos en las muestras tumorales. En el estudio estadístico no se ha encontrado relación estadísticamente significativa en ninguno de los dos marcadores, pero al igual que en el cáncer de recto, VEGF tiene una mayor expresión en tejido tumoral que Endoglina.

		ENG Tumoral	VEGF Tumoral
N	Válido	42	43
	Perdidos	51	50
Media		2,28	5,57
Mediana		1,29	2,43
Desviación estándar		3,10	9,42
Mínimo		0,07	0,23
Máximo		14,42	48,58

Tabla 35. Expresión de RNA de Eng y VEGF en los criomoldes obtenidos.

3.2.2. Niveles de proteína soluble de Endoglina y VEGF en plasma

Al igual que en el cáncer de recto, el momento en el cuál obtuvimos más muestras de plasma fue en el preoperatorio, posteriormente fuimos perdiendo pacientes. Hemos calculado la media de VEGF y Eng en cada uno de los momentos como mostramos en las tablas 36 y 37.

ENG (ng/mL)		0m	3m	6m	9m
N	Válido	81	30	14	14
	Perdidos	12	63	76	79
Media		5.33	5.57	6.15	4.92
Mediana		5.06	5.14	6.26	4.62
Desviación estándar		2.06	2.04	2.52	1.41
Mínimo		1.87	2.44	2.48	2.88
Máximo		110.27	9.94	12.14	7.92

Tabla 36. Valores obtenidos en plasma de Eng.

VEGF (pg/mL)		0m	3m	6m	9m
N	Válido	81	30	17	14
	Perdidos	12	63	76	79
Media		107.93	77.49	86.06	71.06
Mediana		56.24	41.54	14.20	26.43
Desviación estándar		142.48	117.07	166.57	108.45
Mínimo		0	0	0	0
Máximo		976.35	504.45	683.67	396.90

Tabla 37. Valores obtenidos en plasma de VEGF.

En la figura 52 se muestra la evolución en el tiempo de estos niveles. La Endoglina se mantiene con pocas variaciones a lo largo del tiempo salvo un pequeño repunte a los 6 meses. VEGF, al contrario, parte de niveles elevados en el momento 0 y va disminuyendo a lo largo del tiempo. Posteriormente explicaremos más detalladamente su relación con otras variables y su significación estadística que es realmente el objetivo de nuestro estudio.

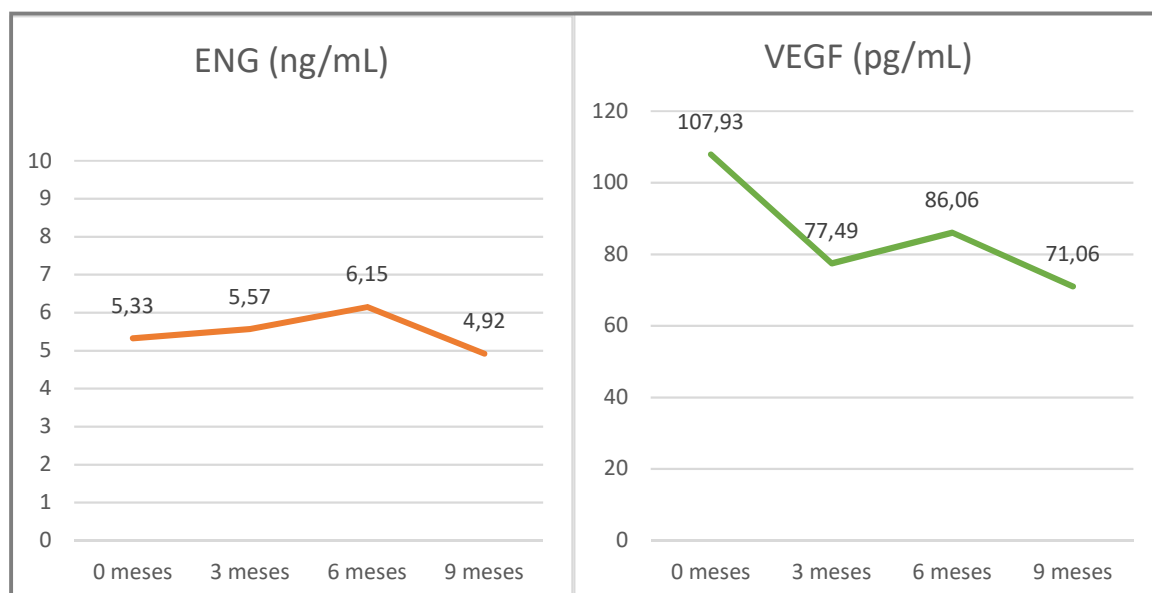


Figura 52. Evolución en el tiempo de los valores en plasma de Eng y VEGF.

3.2.3. Tinción por inmunohistoquímica de Endoglina (parafinas)

Las muestras que pudimos rescatar para realizar la tinción de IHQ, tanto en tejido tumoral como no tumoral fueron un total de 45. De estos 45, dos correspondían a pólipos y dos a carcinomas in situ, 6 muestras a un cáncer estadio I, 15 a estadio II, 13 a estadio III y 7 muestras a estadio IV. El protocolo que seguimos fue exactamente el mismo que en las muestras de cáncer de recto con los mismos inconvenientes a la hora de examinar las muestras. Nuevamente nos fijamos en el Ac de la Eng, que al fijarse con los tejidos donde se expresa y gracias a la reacción de la peroxidasa se revela como una tinción marrón más o menos brillante.

Cada pareja de muestras ha sido revisada individualmente, comparando su proporción de Eng en la zona tumoral y no tumoral, y posteriormente las revisamos en conjunto para intentar comprender el funcionamiento de la Eng en el cáncer de colon.

De las 45 muestras, 19 pudimos compararlas con su nivel de expresión de RNA en tejido tumoral, del resto no se pudo dado que desconocíamos este dato. Se observó correlación entre el nivel de RNA expresado y la proporción de tinción específica (flecha roja). Mostramos los ejemplos más característicos con las siguientes imágenes de tejido tumoral ampliadas (Figuras 53-56).

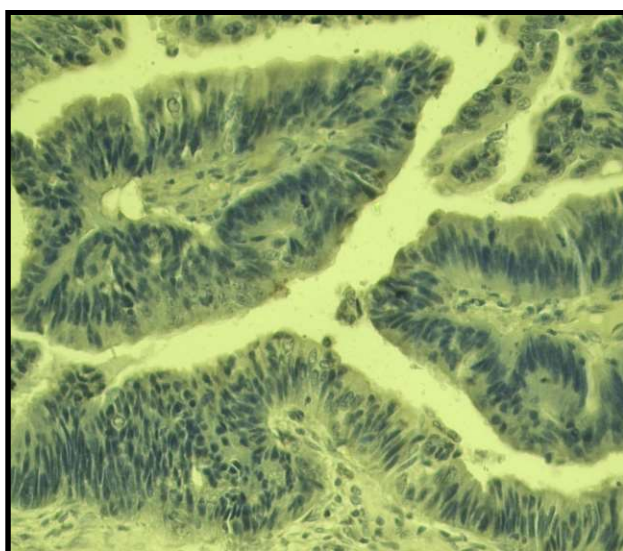


Figura 53. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de tejido tumoral de cáncer de colon. Nivel de RNA en tejido tumoral: 0.72

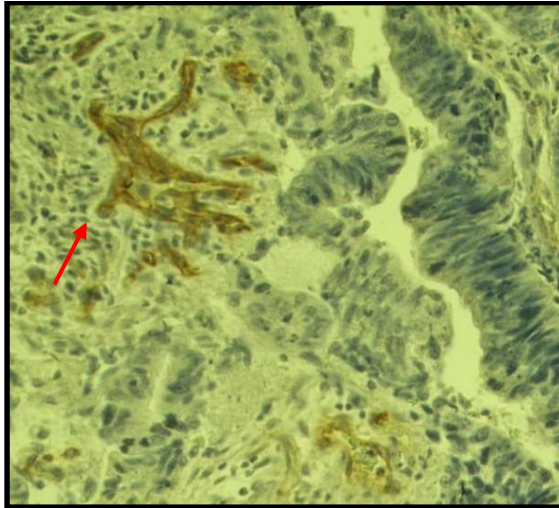


Figura 54. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de tejido tumoral de cáncer de colon. Flecha roja indica tinción específica de Endoglina en tejido tumoral. Nivel de RNA en tejido tumoral: 0.97

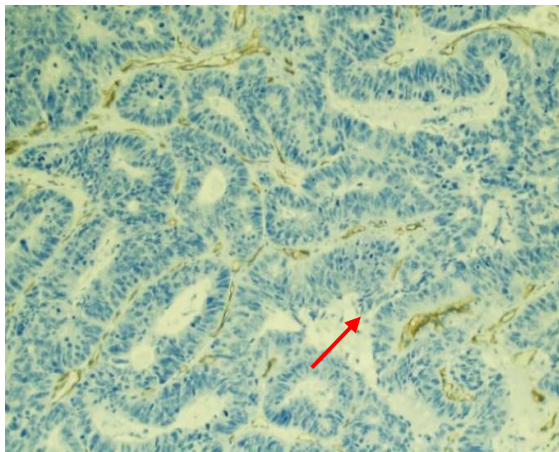


Figura 55. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de tejido tumoral de cáncer de colon. Flecha roja indica tinción específica de Endoglina en tejido tumoral. Nivel de RNA en tejido tumoral: 1.82

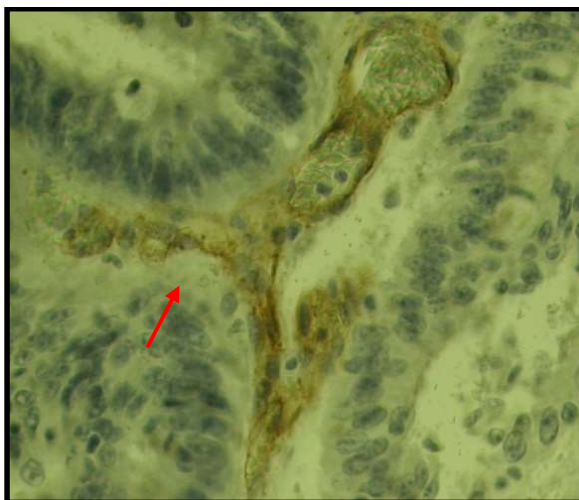


Figura 56. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de tejido tumoral de cáncer de colon. Flecha roja indica tinción específica de Endoglina en tejido tumoral. Nivel de RNA en tejido tumoral: 14.42

En el caso del cáncer de colon tampoco pudimos establecer relación entre la IHQ y los estadios según TNM porque en todos ellos se observa tinción sin presentar un predominio en alguno de los estadios.

La relación que hemos podido establecer con los niveles de solEng es similar a la del cáncer de recto, pero con ciertas particularidades. En primer lugar, en el cáncer de colon observamos mayor tinción de la Endoglina en todos los estadios, tanto en zona tumoral como no tumoral, sin un claro predominio en una u otra zona. En segundo lugar, lo que observamos nuevamente es que en aquellas muestras de pacientes con niveles mayores de solEng (Figuras 60 y 61), la tinción que predomina en el tejido tumoral es la del estroma (flecha amarilla), a diferencia de los pacientes con niveles bajos o intermedios de solEng (Figuras 57-59) donde se observa tinción tanto del estroma como de las membranas de los túbulos (flecha roja).

En las siguientes imágenes mostramos algunas de las muestras más interesantes y representativas de nuestro estudio en cáncer de colon:

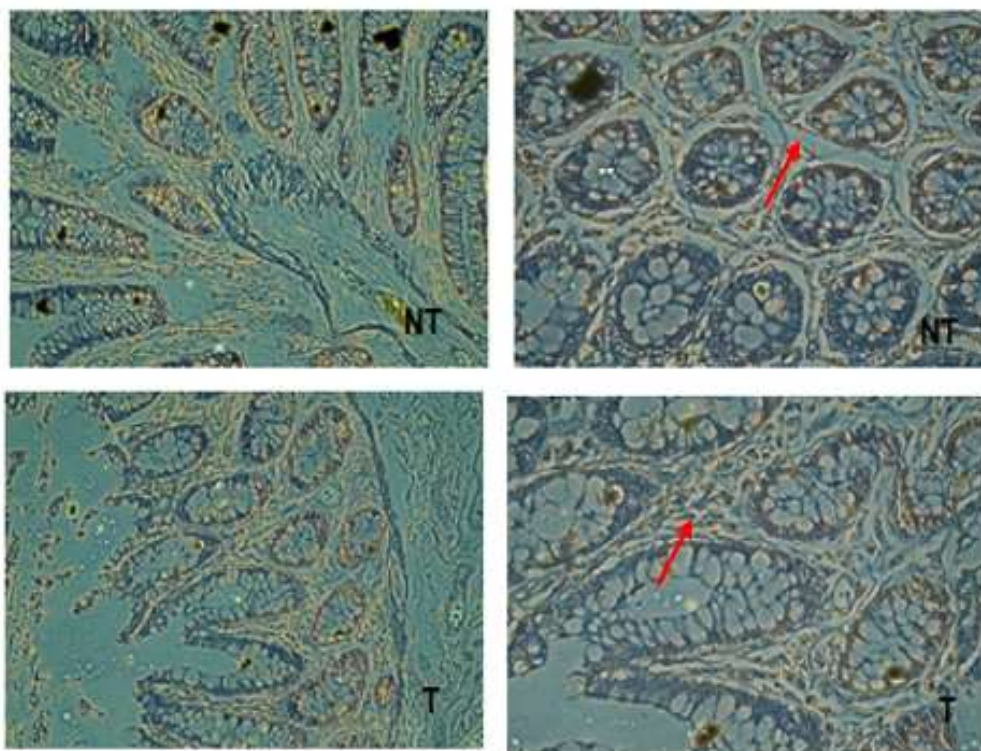


Figura 57. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de colon. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha roja indica tinción específica de Endoglina tanto en la membrana de los túbulos como en el estroma de zona tumoral y no tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 2.70

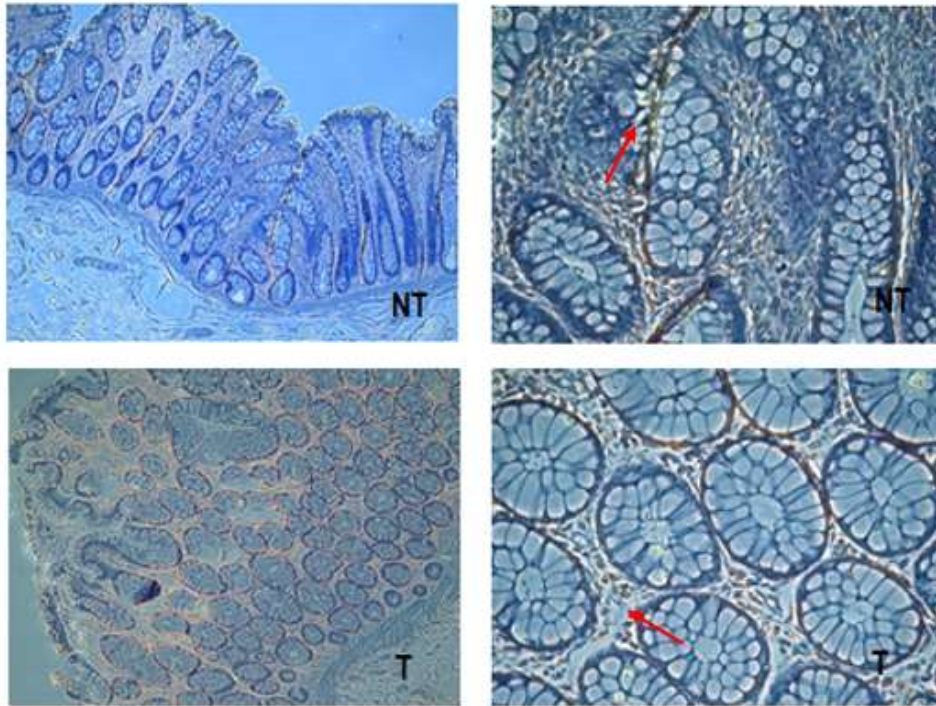


Figura 58. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de colon. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha roja indica tinción específica de Endoglina tanto en la membrana de los túbulos como en el estroma de zona tumoral y no tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 3.22

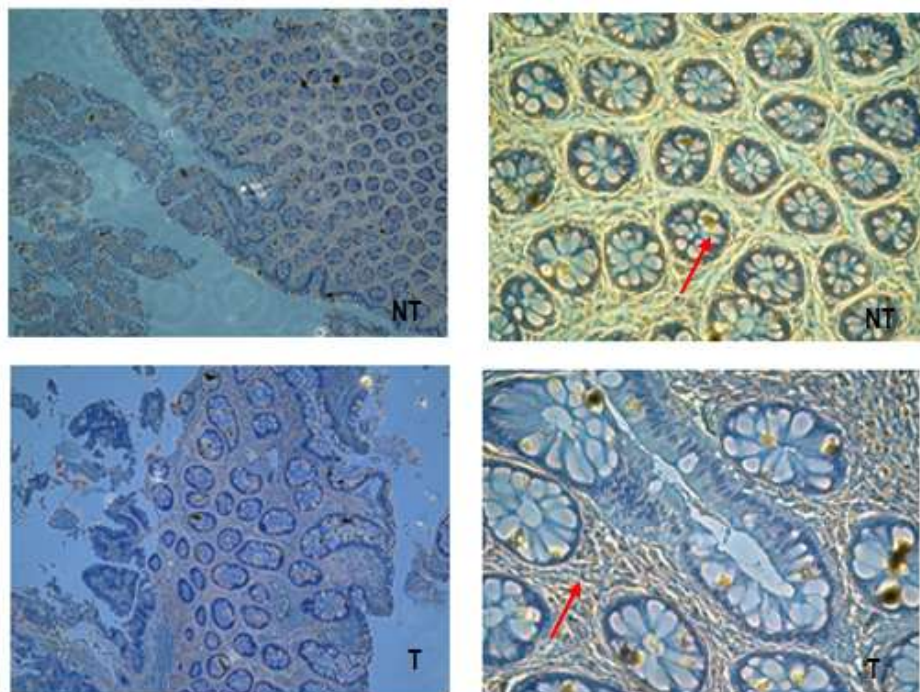


Figura 59. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de colon. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha roja indica tinción específica de Endoglina tanto en la membrana de los túbulos como en el estroma de zona tumoral y no tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 6.05

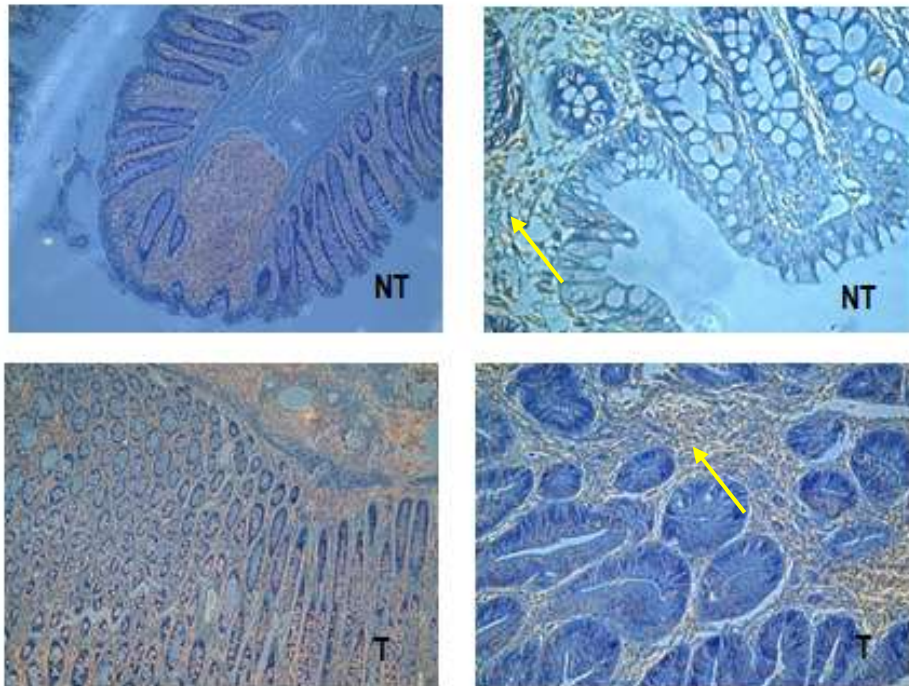


Figura 60. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de colon. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha amarilla indica tinción específica de Endoglina únicamente en el estroma de zona tumoral y no tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 8.51

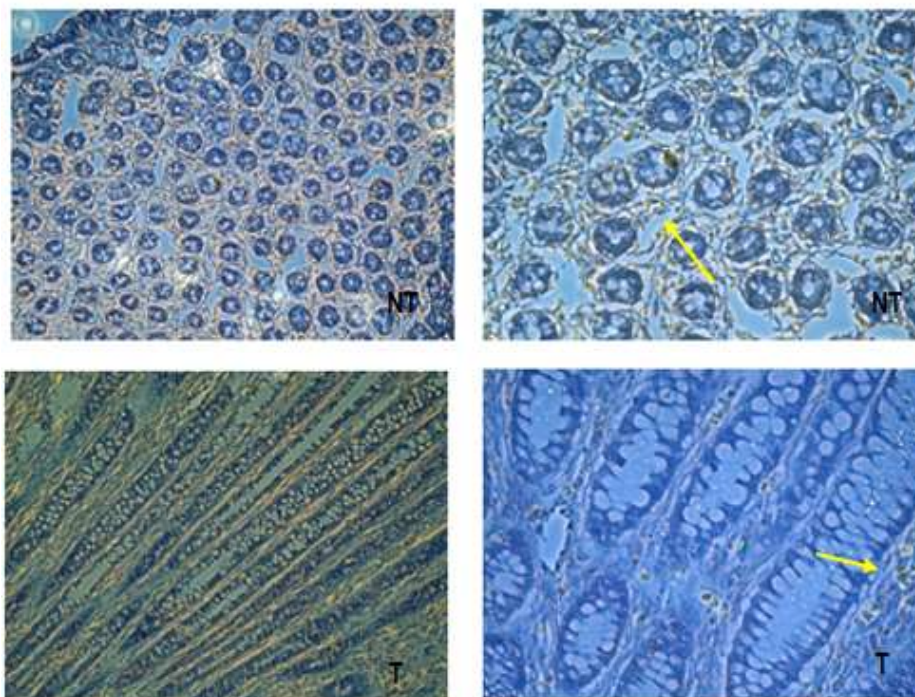


Figura 61. Inmunohistoquímica de Endoglina en muestra de paciente con cáncer de colon. Representación del tejido tumoral (T) y no tumoral (NT). Flecha amarilla indica tinción específica de Endoglina únicamente en el estroma de zona tumoral y no tumoral. Nivel de Endoglina soluble: 9.01

3.3. CONTRASTE DE VARIABLES:

La **edad**, el **sexo** y la **localización del tumor** son variables independientes, no presentan relación estadísticamente significativa ni entre ellas ni entre otras variables.

Respecto a la **biopsia** realizada en la colonoscopia diagnóstica encontramos relaciones significativas con el estadio TNM y con la adyuvancia. La tabla 38 muestra estas relaciones y su significación estadística.

VARIABLE	AP DE LA BIOPSIA POR COLONOSCOPIA				Prueba Chi Cuadrado
	ADENOCARCINOMA		PÓLIPO		
	N	%	N	%	
Estadio TNM:					p= 0
Pólipo	0	0	5	29.4	
Estadio 0 (Tis N0)	0	0	4	23.5	
Estadio I (T1-T2 N0)	9	11.8	5	29.4	
Estadio IIA (T3 N0)	20	26.3	3	17.6	
Estadio IIB (T4 N0)	10	13.2	0	0	
Estadio IIIA (T1-T2 N1)	2	2.6	0	0	
Estadio IIIB (T3-T4 N1)	16	21.1	0	0	
Estadio IIIC (T1-T4 N2)	7	9.2	0	0	
Estadio IV (T1-4 N1-2 M1)	12	15.8	0	0	
Estadio TNM modificado:					p= 0
Menos agresivo	39	51.3	17	100	
Más agresivo	37	48.7	0	0	

Tabla 38. Biopsia vs estadio TNM y metástasis a los 9 meses.

El **estadio TNM** es la variable con más relaciones estadísticamente significativas que observamos. Presenta relación con la existencia de metástasis, su aparición en los distintos momentos medidos, su localización, así como con el tratamiento adyuvante. No se ha hallado relación significativa con la localización del tumor primario ni con la supervivencia. La tabla 39 resume estas relaciones y su significación estadística.

VARIABLE	ESTADIO TNM MODIFICADO				Prueba Chi- Cuadrado
	Más agresivo		Menos agresivo		
	N	%	N	%	
Metástasis a los 0 meses					p= 0
Si	12	32.4	0	0	
No	25	67.6	56	100	
Metástasis a los 3 meses					p= 0
Si	13	35.1	2	3.6	
No	24	64.9	54	96.4	
Metástasis a los 6 meses					p= 0
Si	13	35.1	3	5.4	
No	24	64.9	53	94.6	
Metástasis a los 9 meses					p= 0
Si	14	37.8	3	5.4	
No	23	62.2	53	94.6	
Localización					p= 0.03
Sin metástasis	19	51.4	48	85.7	
Hepáticas	9	24.3	5	8.9	
Pulmonares	1	2.7	1	1.8	
Ganglionares	0	0	1	1.8	
Otras lx	3	8.1	1	1.8	
Dos lx	3	8.1	0	0	
Tres lx	2	5.4	0	0	
Adyuvancia					p= 0
Si	29	78.4	13	23.2	
No	8	21.6	43	76.8	

Tabla 39. Estadio según clasificación TNM modificado vs metástasis (tiempo y localización) y adyuvancia.

Respecto a las **variables moleculares**, explicaremos por un lado el análisis de la expresión de RNA en el tejido tumoral y por otro el análisis de los niveles registrados en plasma en los distintos momentos medidos, en Eng y VEGF respectivamente.

3.3.1. Expresión de RNA en tejido tumoral (criomoldes)

Los criomoldes se analizan por PCR cuantitativa, y para cuantificar los valores obtenidos en el tejido tumoral, se usa como valor de la parte no tumoral o control el valor 1.

Hemos intentado buscar una correlación entre el nivel de expresión molecular en el tejido tumoral y la agresividad del tumor. No se ha observado que, en función del estadio tumoral, más o menos agresivo, existan diferencias estadísticamente significativas ni en Eng ni en VEGF ($p=0.75$ y $p=0.60$, respectivamente).

Si se ha observado que la expresión de VEGF es más fuerte que la de Eng, aproximadamente el 80% de los tumores expresan VEGF con valores superiores al valor control 1 frente a un 60% de tumores que expresan Eng, como se muestra en las tablas 40 y 41.

Como marcador tumoral, sin llegar a ser estadísticamente significativo, el VEGF tiene una expresión más fuerte que la Eng pero no es debido a la agresividad tumoral.

TNM modificado	Expresión de VEGF en tejido tumoral	
	≤ 1	>1
Menos agresivo	16%	84%
Más agresivo	22.2%	77.8%
Total	18.6%	81.4%

Tabla 40. Estadio TNM modificado vs expresión génica en tejido tumoral de VEGF.

TNM modificado	Expresión de Eng en tejido tumoral	
	≤ 1	>1
Menos agresivo	40%	60%
Más agresivo	35.3%	64.7%
Total	38.1%	61.9%

Tabla 41. Estadio TNM modificado vs expresión génica en tejido tumoral de Eng.

3.3.2. Relación entre el estadio preoperatorio (cTNM modificado) y niveles preoperatorios comparado con sujetos sanos

▪ Endoglina

El 79% de los pacientes presentaban niveles superiores al valor considerado como positivo tumoral que es igual o mayor a 3.5 ng/ml. Analizando según el estadio TNM modificado, el 75% de los estadios menos agresivos presentaban valores positivos tumorales frente al 84.8% de los tumores más agresivos. Esta relación no ha sido estadísticamente significativa, pero se observa una clara tendencia a un aumento de los niveles de Eng circulante en aquellas personas con cáncer de colon comparado con sujetos sanos.

TNM modificado	Niveles de Eng en plasma	
	< 3.5	≥ 3.5
Menos agresivo	25%	75%
Más agresivo	15.2%	84.8%
Total	21%	79%

Tabla 42. Niveles de Eng en plasma en momento 0 según cTNM modificado.

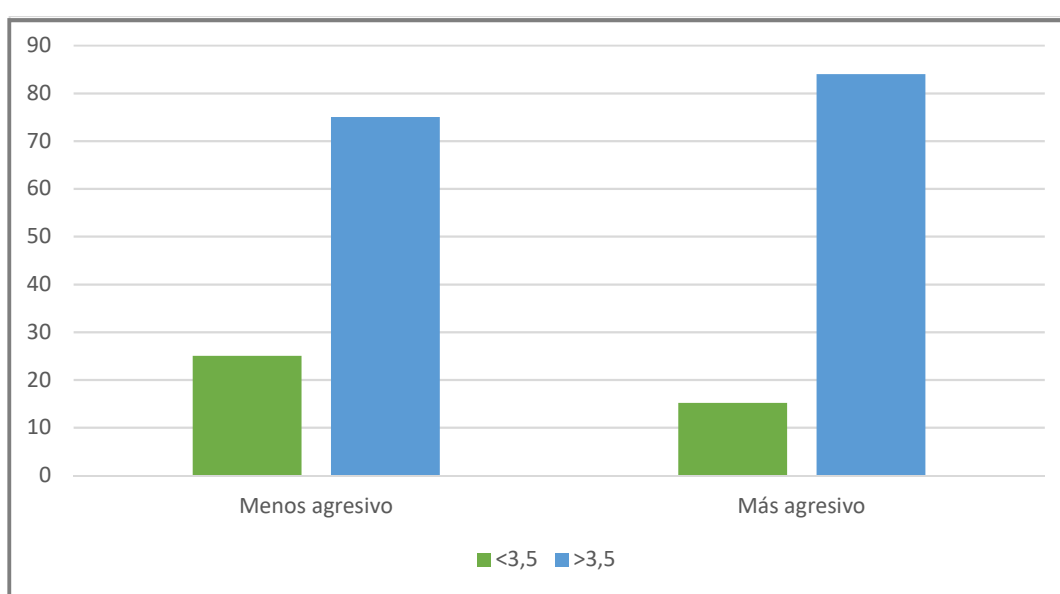


Figura 62. Gráfico de porcentajes cTNM versus nivel de Eng.

▪ **VEGF**

En el caso del VEGF tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. El 61.3% de los pacientes tuvieron niveles positivos tumorales y el 38.7% restante valores considerados de personas sanas. Entre los pacientes con estadios menos agresivos el 57.8% fueron positivos tumorales y entre los estadios más agresivos el 66.7%.

TNM modificado	Niveles de VEGF en plasma	
	< 50	≥ 50
Menos agresivo	42.2%	57.8%
Más agresivo	33.3%	66.7%
Total	38.7%	61.3%

Tabla 43. Niveles de VEGF en plasma en momento 0 según cTNM modificado.

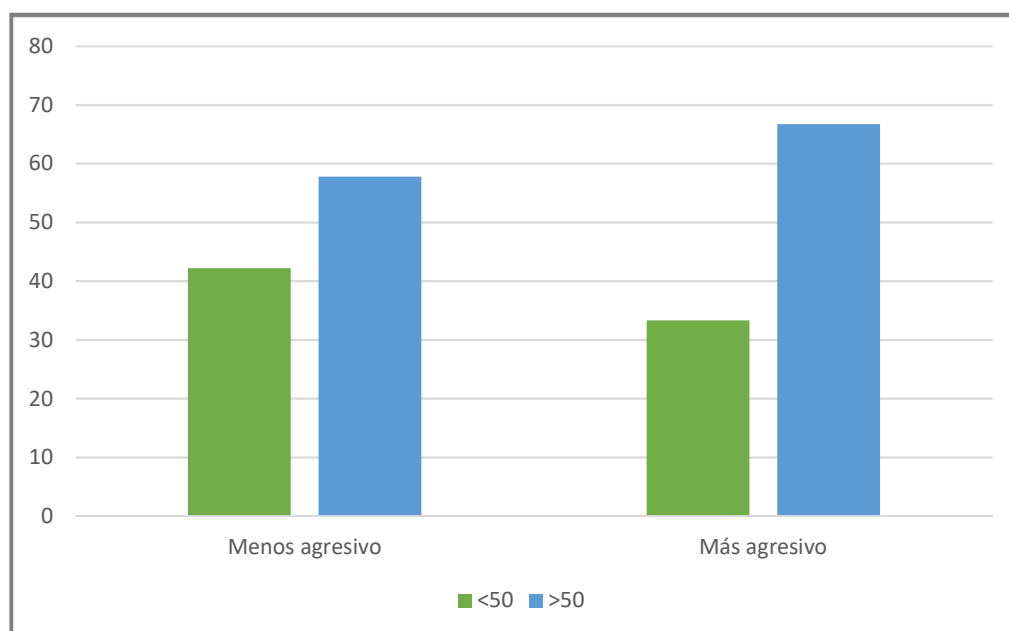


Figura 63. Gráfico de porcentajes cTNM versus nivel de VEGF.

3.3.3. Relación entre estadio preoperatorio (cTNM modificado) y evolución de los niveles en plasma en el tiempo

En la tabla 34 mostramos las medias de los niveles de solEng y VEGF, medidos en cada momento y clasificados según el estadio TNM.

TIEMPO	TNM modificado	ENG (ng/mL)			VEGF (pg/mL)		
		N	Media	Desviación estándar	N	Media	Desviación estándar
0 meses	Menos agresivo	48	5,04	1,96	48	129,16	174,13
	Más agresivo	33	5,74	2,15	33	77,06	67,55
3 meses	Menos agresivo	10	5,89	2,43	10	71,65	154,04
	Más agresivo	20	5,41	1,86	20	80,41	98,25
6 meses	Menos agresivo	5	7,07	3,47	5	63,28	72,66
	Más agresivo	12	5,77	2,08	12	95,55	195,20
9 meses	Menos agresivo	4	4,72	0,75	4	44,83	51,76
	Más agresivo	48	5,04	1,96	48	129,16	174,13

Tabla 44. Estadio según clasificación TNM modificado vs niveles de solEng y VEGF soluble en cada momento medido.

▪ Endoglina

En la evolución de los niveles de solEng según estadio más o menos agresivo, se observa que los niveles tanto al principio (momento 0 meses) como al final del estudio (9 meses) son similares, destaca un repunte a los 3 y a los 6 meses de aquellos tumores menos agresivos. No se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre el estadio TNM y los niveles de sol Eng ($p=0.77$).

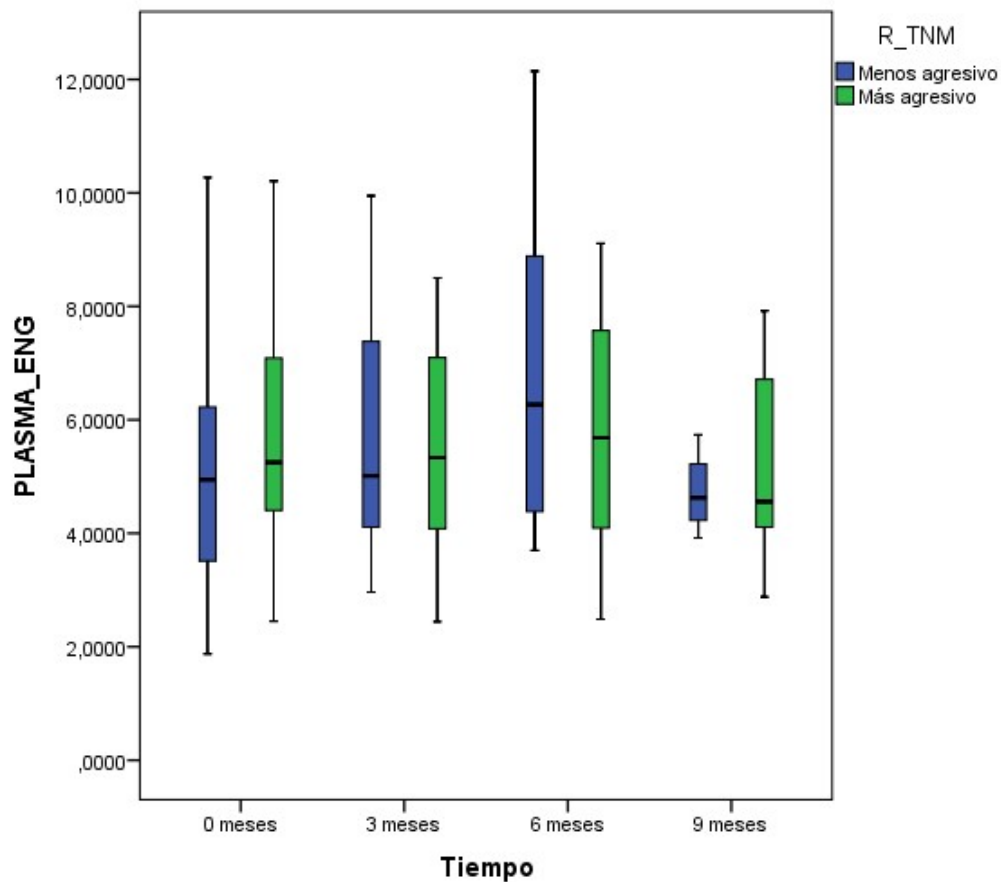


Figura 64. Evolución de la Eng según estadio TNM modificado. El eje de ordenadas representa el nivel en plasma de solEng, el eje de abscisas el mes en el que se obtuvo la muestra, el mes 0 corresponde al preoperatorio. Las cajas azules representan los tumores menos agresivos y las cajas verdes los más agresivos.

▪ VEGF

Al igual que en la Eng, no hemos hallado relación estadísticamente significativa entre los niveles de VEGF y el estadio TNM modificado ($p>0.05$). Cabe destacar que el comportamiento es similar al del cáncer de recto, aquellos tumores menos agresivos tienen niveles en paulatino descenso al cabo de los meses, mientras que los más agresivos persisten con cifras elevadas superiores a las que hemos considerado normales.

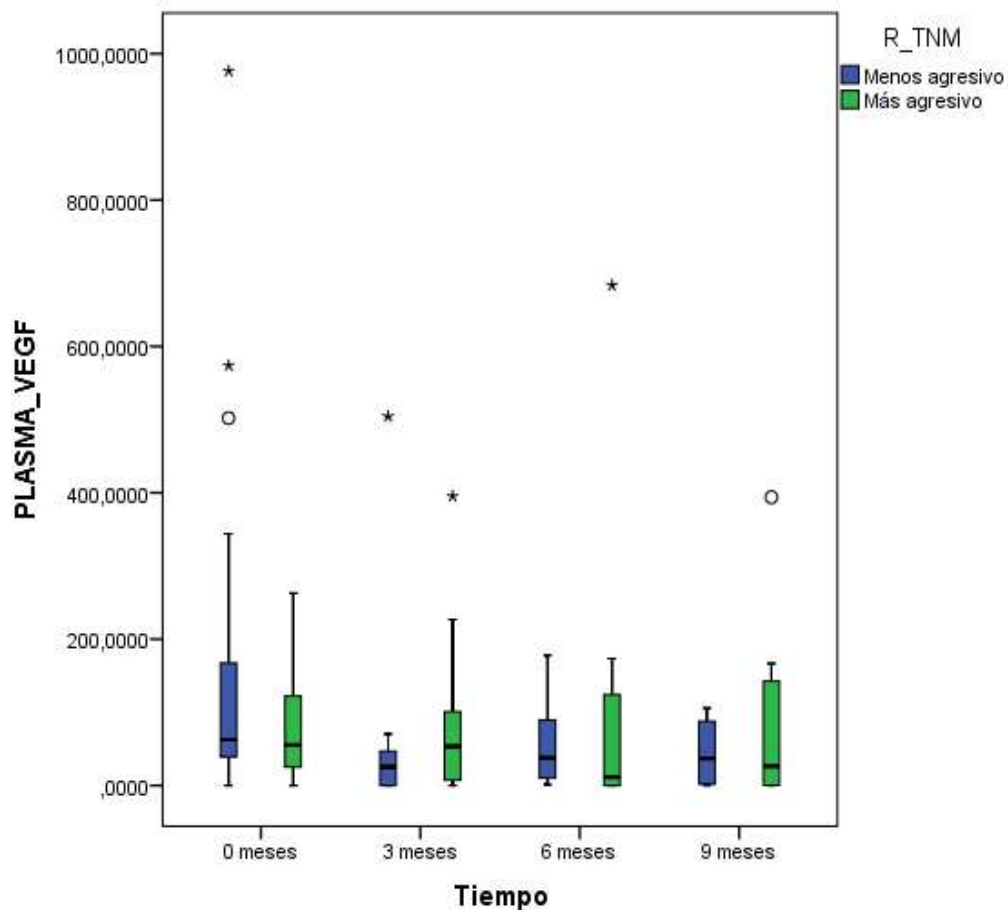


Figura 65. Evolución del VEGF según estadio TNM modificado. El eje de ordenadas representa el nivel en plasma de solEng, el eje de abscisas el mes en el que se obtuvo la muestra, el mes 0 corresponde al preoperatorio. Las cajas azules representan los tumores menos agresivos y las cajas verdes los más agresivos.

3.3.4. Relación entre la evolución de los niveles solubles en plasma y metástasis

En primer lugar, hemos relacionada los niveles en plasma de Eng y VEGF con la existencia de metástasis en los distintos momentos medidos. En la tabla 35 se indica el tamaño muestral y la media obtenida.

TIEMPO	METÁSTASIS	ENG (ng/mL)			VEGF (pg/mL)		
		N	Media	Desviación estándar	N	Media	Desviación estándar
0 meses	No	71	5,27	2,11	71	111,03	149,88
	Si	10	5,76	1,61	10	85,97	71,65
3 meses	No	22	5,43	2,02	22	58,49	111,59
	Si	8	5,95	2,17	8	129,73	123,17
6 meses	No	12	6,61	2,71	12	29,84	53,08
	Si	5	5,04	1,73	5	220,99	266,45
9 meses	No	11	4,67	0,93	11	58,64	116,63
	Si	3	5,84	2,63	3	116,62	66,94

Tabla 45. Niveles de Eng y VEGF vs metástasis.

▪ Endoglina

La tendencia que se observa en pacientes sin metástasis es un aumento a los 6 meses y una disminución a los 9 meses, al contrario de lo que sucede en pacientes con metástasis, que disminuye a los 6 meses y aumenta a los 9 meses. Sin embargo, no se encuentra una relación estadísticamente significativa en este hallazgo ($p=0.71$).

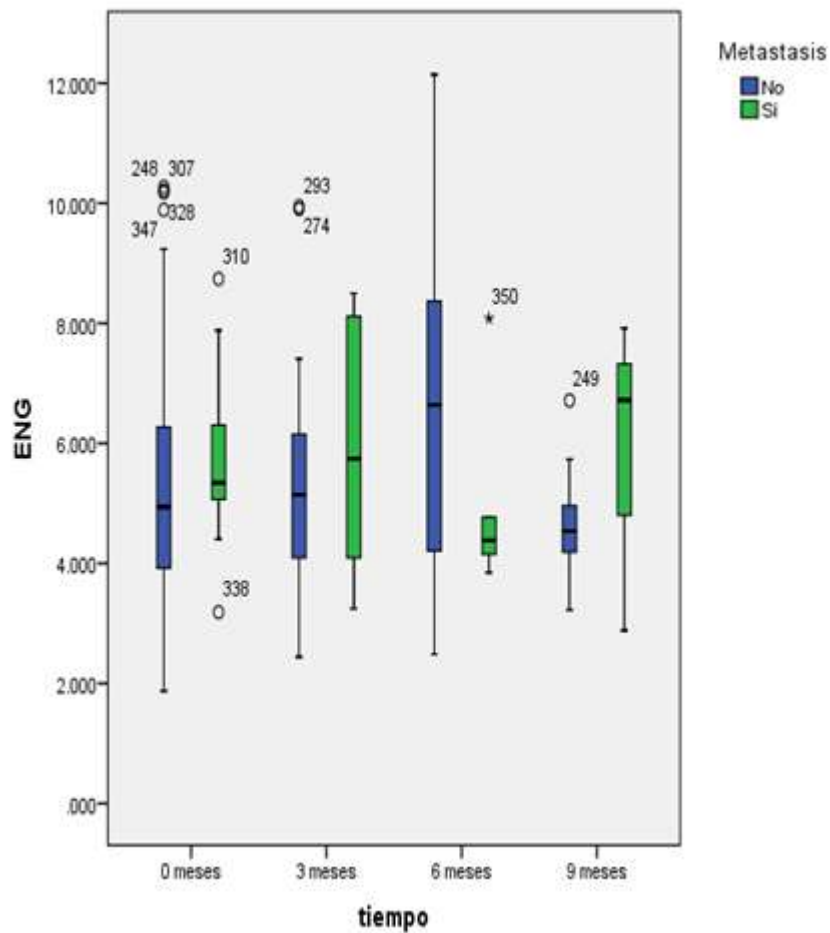


Figura 66. Evolución de la Eng según la existencia de metástasis.

▪ VEGF

En el caso del VEGF la tendencia que se observa es contraria a la observada en la Eng. Los niveles en el momento 0 son similares, pero durante el seguimiento aparecen diferencias estadísticamente significativas ($p=0.02$). los pacientes sin metástasis tienden a disminuir sus niveles en cada control, a diferencia de los pacientes con metástasis que a los 6 meses presentan un repunte importante de los niveles que posteriormente disminuye.

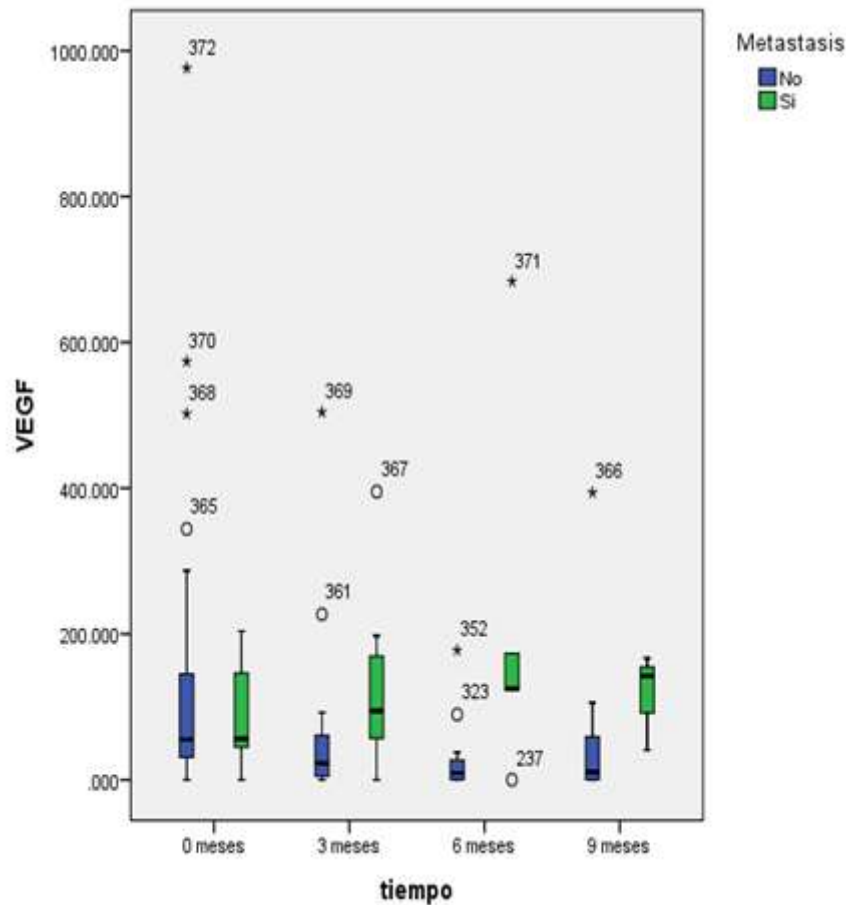


Figura 67. Evolución del VEGF según la existencia de metástasis.

DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es un importante problema de salud pública por su alta incidencia y mortalidad. En España es la tercera neoplasia más frecuente en varones, la segunda en mujeres y la primera en ambos sexos, a nivel mundial es la tercera causa de muerte por cáncer y la cuarta causa de muerte en global. La incidencia y la mortalidad están en descenso gracias a la detección precoz y las mejoras en la terapéutica tanto quirúrgica como médica, sin embargo, entre un 20 y un 34% de los pacientes diagnosticados de novo tienen metástasis en el momento del diagnóstico (Barozzi C. et al., 2002). Su incidencia es mayor en los hombres y la mayoría de los casos son diagnosticados por encima de los 50 años. En nuestro estudio el 63.16% fueron varones frente al 36.84% de mujeres y el 70.67% fueron mayores de 65 años frente al 29.33% menores de 65 años (Brenner H. et al., 2007; Svagzdys S. et al., 2009).

Actualmente el pronóstico y el tratamiento se basan principalmente en el estadio clínico e histopatológico, según el sistema TNM que valora el tumor primario (T), el compromiso ganglionar (N) y la existencia de metástasis a distancia (M). La supervivencia a largo plazo depende igualmente del estadio tumoral, considerado el factor más importante de mortalidad. La supervivencia a los 5 años para la enfermedad localizada es del 90%, y tan sólo del 10% para la enfermedad metastásica. El 70% de los pacientes diagnosticados de CCR no presentan enfermedad a distancia y la cirugía es el pilar del tratamiento curativo, si bien existe un 50% de recurrencia local. El 50-60% de los pacientes diagnosticados de CCR desarrollan enfermedad a distancia. Un 25% aproximadamente presentan metástasis sincrónicas en el momento del diagnóstico, pero son las metástasis metacrónicas, después del tratamiento locoregional del CCR, las más frecuentes, siendo el hígado la localización más común. En nuestro estudio, respecto al grupo global de CCR, 12.78% presentaron metástasis sincrónicas al diagnóstico y un 12.72% metástasis metacrónicas durante el periodo de seguimiento, un 55.17% del total de metástasis se localizaron en el hígado.

El cáncer de recto es el causante del 8% de muertes en todo el mundo, la incidencia de recurrencia local después de la resección curativa está entre el 4 y el 32% con una media del 15%. Los esfuerzos para mejorar el pronóstico del cáncer de recto se han intensificado en controlar la recurrencia local. La neoadyuvancia con quimioradioterapia (QTRT) seguido de la resección quirúrgica con excisión total del mesorrecto (ETM) ha mejorado la recurrencia local pélvica y la supervivencia, siendo hoy día el tratamiento estándar del adenocarcinoma rectal

localmente avanzado, lo que da lugar a una disminución de masa tumoral y a un incremento de resecciones completas (R0), aumentando la capacidad de conservar el aparato esfinteriano. La QTRT preoperatoria logra disminuir el estadio inicial en el 30-60% de los pacientes, lo que suele asociarse a un mejor pronóstico en comparación con aquellos pacientes que no responden. La respuesta patológica completa definida como la imposibilidad de identificar células neoplásicas viables en la pieza quirúrgica tras recibir neoadyuvancia, varía entre el 10 y el 30% en la literatura actual.

En nuestro estudio, en el grupo de cáncer de recto hemos observado relaciones estadísticamente significativas y concordantes con lo escrito en la bibliografía actual. Los tumores en recto medio e inferior representaron el 84.6% de los estadios más agresivos (estadio III y IV), el 100% de los tumores en esta localización recibieron neoadyuvancia y el 74.1% adyuvancia. Tras recibir QTRT preoperatoria, un 64% de pacientes lograron disminuir su estadio inicial y un 16% lograron una respuesta patológica completa. También hemos observado una relación estadísticamente significativa entre los tumores de recto en estadios más agresivos, independientemente de su localización y la aparición de metástasis, así como su presencia en más de una localización (Codina A. et al., 2013; Habr-gama, A. et al., 2011; MacGregor T. et al., 2012).

Dado que el diagnóstico temprano es crítico para mejorar las tasas de supervivencia en el CCR, los avances en la comprensión de la genética molecular del CCR están siendo muy importantes. Se están desarrollando una variedad de biomarcadores utilizados como marcadores de detección temprana, pronóstico, predicción a la respuesta del tratamiento y desarrollo de nuevas estrategias o drogas terapéuticas dirigidas específicamente a los factores responsables de la invasividad del tumor. Ejemplo de ello lo suficientemente validados, son la inestabilidad de microsatélites como marcador genético del Síndrome de Lynch, la mutación de KRAS que predice una mala respuesta al tratamiento con anti-EGFR o la inestabilidad cromosómica como marcador de mal pronóstico. El objetivo final de este campo de estudio es identificar biomarcadores clínicamente relevantes, costo-efectivos, fáciles de emplear en el entorno clínico y que contribuyan a tomar decisiones en el manejo del paciente (Grady W. et Pritchard, 2014; González-Pons M. et Cruz-Correa M., 2015.). La identificación de marcadores moleculares pronósticos capaces de categorizar a los pacientes con alto riesgo de desarrollar metástasis o recurrencia y por tanto de predecir la progresión de la enfermedad ha sido uno de los objetivos en nuestro estudio.

La angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos y es esencial para el crecimiento tumoral maligno, progresión y metástasis (Folkman J., 1990). Es fundamental para que la masa tumoral se desarrolle y esta neovascularización promueva el crecimiento tumoral al aportarle oxígeno, nutrientes y liberación de factores de crecimiento (Saad RS. et al., 2005). Se ha propuesto como un marcador pronóstico en una variedad de tumores malignos y se ha realizado un gran esfuerzo en encontrar marcadores específicos.

Por estos motivos nos hemos centrado en la identificación de marcadores implicados en la angiogénesis tumoral en el CCR, regulada por diversos factores que participan en distintas vías de señalización. El objetivo de nuestro estudio ha sido estudiar concretamente el comportamiento del VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) y la Endoglina (coreceptor de la superfamilia TGF- β "Transforming Growth Factor") en el CCR.

Parte de nuestros objetivos han sido ya descritos en el apartado resultados, concretamente el estudio de las características demográficas y seguimiento de los pacientes, así como el análisis histológico y molecular de VEGF y Endoglina. Los objetivos enfocados a determinar el papel de ambas moléculas como marcadores diagnósticos, pronósticos y/o de seguimiento acorde con las hipótesis establecidas son los que vamos a desarrollar a continuación.

▪ VEGF

En 1983, Donald Senger y su grupo de investigación describieron una proteína homodimérica que incrementaba la permeabilidad vascular en la piel, identificada a partir del fluido ascítico del cultivo de una línea celular de hepatocarcinoma de cobaya y la denominaron factor de permeabilidad vascular (VPF). En 1989, Ferrara y Henzel identificaron un factor de crecimiento para las células endoteliales en las células foliculares de la pituitaria bovina, por lo que lo llamaron VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor"), lo secuenciaron y encontraron que era idéntico a VPF (Ferrara N., 2002).

Actualmente, VEGF es considerado uno de los factores más importantes implicados en la angiogénesis tumoral pero numerosos estudios fueron realizados para comprobar este hecho. En 1992, el grupo de investigación de Eli Keshet y colaboradores, encontraron que el

RNA del VEGF se expresaba ampliamente en el glioblastoma multiforme altamente agresivo. La expresión era mayor en las zonas isquémicas lo que indicaba que podría estar inducida por la hipoxia, hecho que se confirmó por estudios *in vitro* (Shweiki D. et al., 1992).

Sin embargo, hasta 1993 no se publicó la primera evidencia convincente de que el crecimiento tumoral dependía de la angiogénesis, gracias a la demostración de que inhibidores de VEGF evitan el crecimiento tumoral. El grupo de Ferrara llevó a cabo una serie de experimentos con anticuerpos monoclonales anti-VEGF con el objetivo de ralentizar el crecimiento tumoral. Los resultados confirmaron dicha hipótesis, reduciendo el crecimiento de una línea celular de glioblastoma aproximadamente el 80%, incluso hubo un efecto mayor en otro tipo de tumores. Los anticuerpos, sin embargo, no tuvieron ningún efecto sobre las células tumorales, confirmando la teoría de que la inhibición de la angiogénesis es el mecanismo *in vivo* de la supresión tumoral (Kim KJ et al., 1993)

Posteriormente este anticuerpo fue humanizado dando lugar al anticuerpo recombinante denominado Bevacizumab, conservando su capacidad de inhibir el crecimiento *in vivo* de las células tumorales humanas, por lo que fue evaluado su uso en ensayos clínicos en humanos. Los ensayos de fase I con Bevacizumab en monoterapia demostraron que generalmente era bien tolerado y sin efectos graves, además su uso combinado con otros quimioterápicos demostró una sinergia debido a que el bloqueo del VEGF sensibiliza el endotelio al efecto de otros agentes citotóxicos. En estudios clínicos fase II y fase III, se comprobó efectivamente que las tasas de respuesta y la supervivencia libre de progresión eran superiores con su combinación a quimioterápicos de primera línea.

Finalmente, en febrero de 2004, la US FDA (US Food and Drug Administration) seguido de la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) aprobó su uso en el CCR metastásico. A partir de esta fecha, su uso ha sido aprobado para el tratamiento de otros tumores como, por ejemplo, segunda línea del CCR metastásico en junio de 2006, cáncer de pulmón no microcítico en octubre de 2006 o cáncer renal metastásico en julio de 2009 (Ferrara N. et al., 2016).

A pesar del éxito demostrado del Bevacizumab y otros tratamientos antiangiogénicos, un número significativo de pacientes tienen una respuesta limitada, que podría deberse a mecanismos inherentes de resistencia para evadir la inhibición de VEGF o por la secreción

tumoral de factores proangiogénicos. Identificar biomarcadores predictivos de la respuesta al tratamiento sería clave para que esta terapia pudiera usarse de la manera más apropiada y rentable. Aunque este no haya sido el objetivo de nuestro estudio nos parece un tema interesante que merece más investigaciones futuras (Bruhn MA. et al., 2014; García V. et al., 2008).

Al comparar nuestros resultados con los publicados por otros autores, nos hemos encontrado con varias limitaciones que ya han sido descritas en numerosos artículos y que dificultan unificar resultados, entre ellas se encuentra la ausencia de criterios uniformes de corte para los estudios, las metodologías no estandarizadas para evaluar las diferentes muestras y los distintos regímenes de tratamiento empleados. Otra limitación importante en la mayoría de los artículos es el concepto de CCR como una única enfermedad, pocos son los estudios que han considerado el cáncer de colon y el cáncer de recto como entidades distintas tal y como hemos considerado nosotros.

Actualmente sigue habiendo debate sobre el origen y la localización del VEGF. El suero, el plasma y la sangre completa se han utilizado comúnmente para determinar sus niveles, pero no está claro que medición proporciona la mejor información. La cantidad de VEGF en los tumores es entre 7 y 70 veces superior a la cantidad en suero y entre 31 y 306 veces superior a la cantidad en plasma, esto indica que el tejido tumoral es una fuente y reservorio importante para el VEGF en un paciente con cáncer. Sin embargo, en comparación con la masa total de VEGF en el cuerpo humano, el tumor contribuye a un porcentaje relativamente pequeño de VEGF y se ha demostrado que es más fácilmente distribuible en sangre y músculo (Kut C. et al., 2007).

Respecto a la expresión de VEGF en los tejidos tumorales, hemos encontrado que es expresado en mayor cantidad que la Endogлина respecto a su expresión en tejidos no tumorales. Concretamente en el cáncer de recto se expresó con niveles muy superiores en tumores de recto inferior con neoadyuvancia comparado con recto superior sin neoadyuvancia (14.83 frente a una media de 3.39), pero la relación no fue estadísticamente significativa. En el cáncer de colon, el 80% de los tumores expresaron VEGF, pero no se encontró relación con la agresividad del tumor medida por estadio tumoral. Tampoco hemos encontrado relación entre la expresión de RNA y los niveles solubles o la aparición de metástasis. En contraste a nuestros resultados, Broll R. y colaboradores encontraron una diferencia significativa entre la

concentración de VEGF en tejido tumoral respecto al tejido adyacente normal. Hubo una asociación clara pero no significativa entre la profundidad de infiltración tumoral y VEGF, y no se pudo comprobar la relación con el tamaño del tumor o sus niveles solubles (Broll R. et al., 2001). El VEGF, por tanto, sin llegar a ser estadísticamente significativo, tiene una expresión fuerte en el tejido tumoral y puede ser considerado como un marcador tumoral, su relación con otras variables clínico-patológicas no ha sido concluyente en nuestro estudio probablemente debido a un tamaño muestral pequeño.

Respecto a nuestros resultados de proteína soluble medida en plasma, cabe considerar las siguientes aclaraciones. En primer lugar, VEGF puede ser medido en suero o plasma, VEGF es almacenados en glóbulos blancos y plaquetas circulantes lo que demuestra que concentraciones más elevadas de VEGF en el suero pueden ser debidas a la degranulación de plaquetas y glóbulos blancos durante la coagulación in vitro más que un reflejo de la actividad angiogénica del tumor. En el plasma, la degranulación de los glóbulos blancos y las plaquetas se minimiza añadiendo anticoagulantes a la sangre, como consecuencia, las concentraciones plasmáticas de VEGF son hasta 20 veces menores que las concentraciones séricas. Hasta el momento el plasma parece ser el preferido para las mediciones en la mayoría de los estudios, pero cuál es el mejor predictor de supervivencia sigue siendo debatido (Werther K. et al., 2002). En segundo lugar, cabe mencionar que nuestro estudio es el primero que realiza mediciones seriadas de los niveles de proteína en plasma preoperatorios, a los 3, a los 6 y a los 9 meses. Los resultados, por tanto, han sido comparados con estudios similares, pero no exactamente iguales.

Los niveles obtenidos preoperatorios fueron significativamente superiores al valor de corte, pero tan sólo el 44.7% de los tumores de recto y el 61.3% de los tumores de colon tuvieron concentraciones elevadas, lo que limita la aplicación de VEGF soluble como un marcador diagnóstico debido a su baja sensibilidad para predecir preoperatoriamente un CCR. Nuestros hallazgos se asemejan a los publicados en 2002 por Werther K. y su grupo danés de estudio del CCR. Por un lado, los niveles en pacientes con CCR son superiores a los valores en sujetos sanos, aunque no hubo una relación estadísticamente significativa en ninguno de los dos estudios. Por otro lado, hemos observado que la media de los niveles en los pacientes con cáncer de colon es superior a la media de los niveles en pacientes con cáncer de recto (107.93 pg/ml y 63.92 pg/ml respectivamente), a pesar de que los tumores de recto fueron

diagnosticados en estadios más avanzados y se asocian a un peor pronóstico lo que indica que éstas diferencias no son un reflejo de la diferencia de estadios sino una diferencia entre ambos tipos de tumores (Werther K. et al., 2002).

Respecto al estadio tumoral y los niveles de VEGF preoperatorios, a diferencia de otros estudios publicados (Bestas R. et al., 2014; Werther K. et al., 2002) no hemos hallado relación estadísticamente significativa. Acorde a nuestros resultados, Broll R. et al no pudieron demostrar una correlación significativa con el estadio tumoral.

En el análisis del estadio tumoral y la evolución de los niveles de VEGF en plasma hemos obtenido resultados claramente representativos, pero sin relación estadísticamente significativa. En este caso hemos encontrado el mismo comportamiento en cáncer de recto y cáncer de colon, a pesar de que los niveles en cáncer de colon son siempre superiores como ya hemos mencionado previamente. En los estadios menos agresivos (I-II), los niveles preoperatorios han sido superiores, pero paulatinamente han ido disminuyendo a los 3, a los 6 y a los 9 meses, hasta alcanzar niveles inferiores al valor de corte. En los estadios más agresivos (III-IV) el comportamiento ha sido el contrario y los niveles han ido en aumento, permaneciendo por encima del valor considerado normal. No se ha encontrado relación significativa con la evolución a largo plazo, posiblemente debido a que el periodo de seguimiento ha sido corto, pero estos datos se orientan hacia la hipótesis descrita por otros autores de que los niveles que persisten elevados indican una peor evolución.

Respecto a la evolución de los niveles de plasma según la existencia de metástasis en el caso del cáncer de recto, los niveles en pacientes con metástasis disminuyen drásticamente del preoperatorio hasta los 6 meses, el tamaño muestral ha sido totalmente insuficiente para extraer conclusiones. En el cáncer de colon con metástasis se observa como los niveles aumentan de manera importante hasta los 6 meses. Este hallazgo concuerda con lo descrito por otros autores, pero nos abre de nuevo la incógnita sobre cuál es el papel como marcador de respuesta al tratamiento con Bevacizumab y otros agentes quimioterápicos, dado que el 80% de los pacientes con metástasis y muestra extraída a los 6 meses recibieron este tratamiento. Desafortunadamente la quimioterapia no es beneficiosa para todos los pacientes, el rango de respuesta al tratamiento va desde una remisión completa patológica a una resistencia. Un 15% de los pacientes muestran una respuesta completa, lo cual es indicativo de un pronóstico mejor, frente a un 30-40% de los pacientes que sufren una

recurrencia local y/o a distancia a pesar de la terapia multimodal. Las células cancerosas resistentes a la quimioterapia contienen múltiples defectos genéticos, como mutaciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones, así como aberraciones epigenéticas. La resistencia a la QT requiere de cambios en la expresión de un gran número de genes, se necesitan más estudios para entender su mecanismo y poder combatirlo.

Karayiannakis y colaboradores realizaron un estudio similar, pero obteniendo las muestras en el preoperatorio, a los 7 días y a los 30 días. Observaron que en aquellos pacientes con resección curativa los niveles aumentaban a los 7 días y posteriormente disminuían a los 30 días, alcanzando niveles inferiores a los preoperatorios. Los aumentos transitorios registrados durante el postoperatorio se asociaron al aumento de la angiogénesis relacionada con la cicatrización posquirúrgica. Aunque el tamaño muestral fue pequeño, el desarrollo de metástasis después de la resección curativa fue más común en aquellos pacientes que no disminuyeron sus valores después de la cirugía, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Karayiannakis AJ. et al., 2002). Con un esquema de trabajo similar, Mysliwiec y colaboradores obtuvieron las medidas en el preoperatorio, al tercer y al décimo día, encontrando una correlación positiva estadísticamente significativa con valores de VEGF-A en plasma y metástasis a distancia (Myśliwiec P. et al., 2004). Nuevamente Werther y su grupo danés de estudio del CCR, publicó en 2003 los resultados obtenidos tras la medición de los niveles a los 6 meses en pacientes con CCR sometidos a resección curativa, y compararon los resultados con el valor pronóstico del CEA postoperatorio. Los niveles de ambos marcadores disminuyeron a los 6 meses, pero los niveles elevados de VEGF no se relacionaron con un peor pronóstico a diferencia de niveles elevados de CEA, pero en teoría, el aumento de las concentraciones circulantes de VEGF debe normalizarse después de la resección quirúrgica, lo que puede reflejar el éxito de la intervención quirúrgica de un tumor maligno (Werther K. et al., 2002; Kumara S. et al., 2009).

Estos hallazgos sugieren que las concentraciones de VEGF en la circulación juegan un papel importante en la progresión tumoral y la formación de metástasis a distancia, pero actualmente no está evaluado como marcador pronóstico en el CCR y para ello se requieren estudios con períodos de seguimiento más largos (Wang et al., 2014). El diagnóstico de macrometástasis se logra a menudo mediante las pruebas de imagen, sin embargo, si nuestro objetivo es detectar micrometástasis, los marcadores moleculares son necesarios y tienen un

valor potencial ofreciendo información pronóstica que no ofrecen otros parámetros clinicopatológicos convencionales.

El Bevacizumab ha demostrado su eficacia, pero existe poca información sobre su relación con los niveles de VEGF y su aplicabilidad para predecir la respuesta al tratamiento. Igualmente se requieren más estudios para validar si puede utilizarse como biomarcador para identificar pacientes que puedan beneficiarse del tratamiento, así como de respuesta al tratamiento.

▪ Endogлина

La Endogлина, también llamada CD105, se identificó por primera vez en 1988 por Gougos y Letarte, como un marcador de células endoteliales humanas mediante un anticuerpo monoclonal, creado para combatir una línea de células leucémicas pre-B. Dos años más tarde se identificó como una glicoproteína de membrana presente en células endoteliales y fue entonces cuando se le acuñó el nombre de Endogлина. Otros estudios han demostrado que la Endogлина también se expresa en una amplia variedad de tejidos y tipos celulares como macrófagos, precursores eritroides, sincitiotrofoblastos de la placenta terminal, fibroblastos, células estromales, células del músculo liso, queratinocitos de la epidermis, así como en ciertos tumores.

En la última década se ha avanzado en la comprensión de su papel funcional gracias al mejor conocimiento de su estructura y sus vías de señalización. Se ha demostrado que sus mutaciones producen la HHT1 (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia 1) y que constituye un potente marcador de la neovascularización asociada a los tumores (García-Pozo L. et al., 2008; Duff S. et al., 2003).

La Endogлина es un componente del complejo de receptores TGF- β , capaz de unir TGF- β 1 y TGF- β 3 con gran afinidad en presencia de los correspondientes receptores T β R-I y T β R-II. La familia de citoquinas TGF- β (Transforming Growth Factor) comprende más de 40 factores que juegan un papel crucial en numerosos procesos biológicos. Se ha demostrado que TGF- β tiene un papel dual y paradójico en el cáncer, como supresor y promotor, demostrado en el proceso de carcinogénesis en el cáncer de piel de ratones transgénicos. Se piensa que TGF- β 1

inhibe la proliferación e induce la apoptosis durante las primeras etapas, pero en etapas posteriores, los niveles TGF- β 1 inducen la producción de factores autocrinos, promoviendo la migración de las células tumorales e induciendo una transición epitelio-mesénquima (TEM) (Oft M. et al., 1998). La mayoría de los estudios sobre la Endoglin y el cáncer se han centrado en su papel como proangiogénico y su utilidad como marcador de MVD (densidad de microvasos), sin embargo, parece que también modula la proliferación, la adhesión y la migración celular, lo que sugiere una participación directa sobre la respuesta de las células tumorales a TGF- β o por un mecanismo independiente no completamente entendido (Pérez-Gómez E. et al., 2010; Bernabeu C. et al., 2009).

El hallazgo de que la Endoglin está sobreexpresada en las células endoteliales de los tejidos sometidos a angiogénesis sugirió que su detección podría utilizarse como un marcador para analizar angiogénesis tumoral mediante la medición de la densidad de microvasos (MVD, del inglés "Microvessel density"). El papel de la angiogénesis como factor pronóstico es muy controvertido en la bibliografía actual. Este hecho podría explicarse por el uso de diferentes anticuerpos contra marcadores endoteliales, el anticuerpo anti-Eng ha resultado ser el más fiable porque es un buen marcador de vasos inmaduros, a diferencia de otros marcadores endoteliales, como CD31 y CD34, que se expresan tanto en vasos maduros como inmaduros. Aunque controvertido, se han visto diferencias entre los estudios reportados por cirujanos y anatomopatólogos (Prall F. et al., 2003).

Algunos autores han relacionado la MVD de forma inversa con la supervivencia, aparición de metástasis o estado ganglionar. Es el caso de Saad y colaboradores., que demostraron una correlación entre el recuento de microvasos a través de la tinción de Endoglin con la presencia de invasión linfoganglionar y metástasis hepáticas (Saad R.S. et al., 2004). En la misma línea, se realizó una evaluación cuantitativa de la angiogénesis para identificar un subconjunto de pacientes con ganglios negativos y alto riesgo de recidiva, aunque las recurrencias totales fueron desconocidas, la angiogénesis fue mayor en aquellos pacientes con recidivas (Frank R.E. et al., 1995). Otras autoras no han encontrado relación con el pronóstico, pero han identificado el proceso de angiogénesis como un hecho fundamental en el proceso de la carcinogénesis colorrectal, aunque con importantes diferencias. Mientras que Paola Bossi y colaboradores, demostraban que el recuento de microvasos aumentaba desde el estadio de pólipo hasta el estadio de adenocarcinoma, Simona Guruzu et al.

observaron que era mayor en las primeras etapas de la proliferación tumoral, aunque tuviera un carácter más bien oscilante (Bossi P et al., 1995; Gurzu et al., 2008). De forma totalmente contraria, Lindmark G. y su equipo de investigación comprobaron que a mayor MVD, mejor pronóstico, considerándolo un factor pronóstico del CCR y Martinovic Z. et al sugirieron en su estudio que un aumento de CD105 en el cáncer de recto se acompañaba de una mejor supervivencia libre de enfermedad (Lindmark et al., 1996; Martinovic Z. et al., 2015).

En nuestro estudio no hemos podido corroborar la hipótesis planteada respecto a la tinción específica de Endoglina, dado que no ha habido relación entre la densidad de microvasos y el estadio tumoral como previamente han mencionado otros autores. Lo novedoso en nuestro estudio ha sido el encontrar una correlación entre la tinción específica y los niveles solubles de Endoglina. Aunque de forma global los niveles de solEng se corresponden a estadios más agresivos, no ha sido posible establecer una relación exacta, pero si una tendencia a relacionarse estas tres variables. Hemos encontrado también diferencias entre las muestras de cáncer de recto y cáncer de colon, pero de nuevo no hemos podido compararlo con estudios previos porque la gran mayoría consideran el CCR como una misma entidad. En el cáncer de recto hemos observado que las muestras asociadas a un nivel bajo de solEng tenían un predominio de tinción específica de Eng en la zona no tumoral en las membranas de los túbulos (o criptas tubulares de Lieberkhün) y en menor medida en el estroma tumoral (zona muy celular y ricamente vascularizada), conforme aumentan los niveles de solEng predomina la tinción del estroma en zona tumoral y en los niveles de solEng muy elevados se llega al extremo de no observarse tinción. En el cáncer de colon, asociado a niveles bajos o intermedios de solEng se observa tinción tanto de las membranas de los túbulos en zona no tumoral como del estroma en zona tumoral, conforme aumentan los niveles séricos observamos nuevamente un predominio de la tinción en el estroma tumoral.

Este hallazgo podría explicarse porque el aumento de la expresión de Eng en las células endoteliales localizadas en el estroma se correlaciona con el aumento de la angiogénesis tumoral, probablemente debido a su papel proangiogénico. Su expresión en las células tumorales disminuye durante la progresión permitiendo una mayor migración de células tumorales, invasión y transición epitelio-mesénquima (TEM), del epitelio simple cilíndrico formado por numerosas glándulas mucosas tubulares denominadas criptas de Lieberkühn al mesénquima o estroma. Por lo tanto, los cambios en la expresión de Endoglina tanto en el

tumor como en el endotelio vascular modulan la malignidad. No existen estudios sobre el papel de la Endoglina en el estroma, su capacidad para promover el crecimiento tumoral y la progresión debe ser investigada en los próximos años (Pérez-Gómez E. et al., 2010; Bernabeu C. et al., 2009).

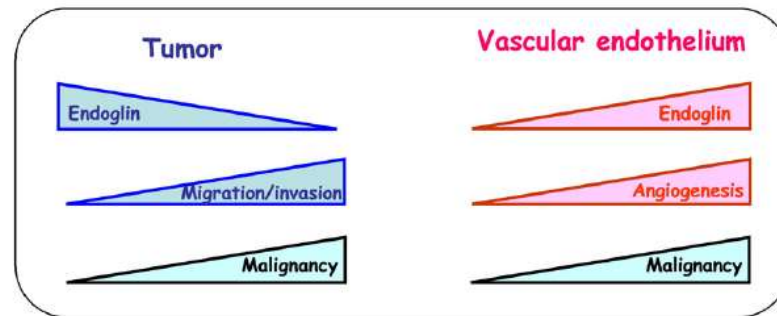


Figura 68. Función de la Endoglina en el cáncer: los cambios en la expresión de la Eng tanto en el tumor como en el endotelio vascular modulan la malignidad tumoral.

Otra explicación a estos hallazgos implica a la Endoglina soluble (solEng), el dominio extracelular de la Endoglina unido a la membrana que puede ser escindido proteolíticamente. Se ha visto que en las células endoteliales la principal metaloproteasa que escinde la Eng es la MMP-14. Lukas J. y colaboradores comprobaron como la coexpresión de Eng de membrana y MMP-14 aumentaba los niveles de Eng soluble, estos datos revelan que la localización en membrana de MMP-14 es por tanto necesaria para un eficiente *shedding* de Endoglina (Lukas JAC et al., 2010). En algunas enfermedades vasculares graves como la esclerosis sistémica o la preeclampsia se han encontrado niveles elevados de solEng con una función antiangiogénica. Esto se debe a que la solEng contiene sitios de unión para diferentes miembros de la superfamilia de TGF- β y actúa como eliminador de ligandos circulantes impidiendo su unión a los receptores funcionales. Es paradójico por tanto que niveles elevados en pacientes con cáncer se asocien a un mal pronóstico, siendo solEng un agente antiangiogénico. Una explicación aceptada a este hecho es que su producción es un evento tardío durante la carcinogénesis y, por lo tanto, su actividad antiangiogénica puede ser irrelevante para el crecimiento del tumor.

En conclusión, unificando las posibles explicaciones para nuestros resultados, la Endoglina se expresa en mayor medida en el endotelio vascular de aquellos tumores en general más agresivos por su función proangiogénica y por ese motivo observamos su tinción

específica en el estroma de la zona tumoral. Paralelamente, la MMP-14 expresada en el endotelio vascular está promoviendo la escisión de la Endogлина que se traduce en niveles superiores de solEng. La función antiangiogénica de la solEng probablemente llegue tarde al proceso tumoral establecido, pero más estudios son necesarios para aclarar su verdadera función.

Respecto a los resultados de Eng soluble de nuestro estudio, encontramos una similitud importante a lo publicado por otros autores. Comparando entre los niveles medios de cáncer de recto y cáncer de colon, al contrario que en VEGF, observamos que los pacientes con cáncer de recto tienen niveles superiores, pero no lo hemos podido comparar con otros estudios porque de nuevo la mayoría de los estudios consideran el CCR como una misma entidad.

Los niveles de solEng preoperatorios han resultado ser superiores al valor considerado normal en el 83.8% de los pacientes con cáncer de recto y en el 79% de los pacientes con cáncer de colon. Aunque en ambos casos los estadios más agresivos tuvieron niveles de solEng superiores a los estadios menos agresivos, no se encontró una relación estadísticamente significativa entre el estadio tumoral y los niveles de Endogлина en plasma. Li y su equipo de investigación obtuvieron resultados similares, en su estudio detectaron solEng en el 95% de los pacientes con CCR comparado con el 80% de los sujetos control, además los niveles fueron significativamente más elevados en pacientes con CCR comparado con los controles. A diferencia de nuestro estudio, lograron establecer una correlación positiva entre CD105 y el estadio tumoral. En otro estudio realizado por Gomceli et. al., igualmente demostró que los niveles en suero de pacientes con CCR estadio III eran significativamente más elevados que en los sujetos control, pero no se correlacionó con los resultados clínicopatológicos. Estos hallazgos podrían explicarse porque la Endogлина se expresa fuertemente en el endotelio de los vasos tumorales, y gracias al *shedding* de las metaloproteasas este aumento de expresión de Endogлина en el endotelio se expresa a nivel soluble (Li C. et al., 2003; Gomceli I. et al., 2013).

Los niveles preoperatorios entre pacientes con y sin metástasis (7.91 ng/mL versus 4.70, respectivamente) han resultado tener una diferencia estadísticamente significativa en el caso del cáncer de recto, y en la misma línea, aunque sin alcanzar la significación en el cáncer de colon (5.76 ng/mL versus 5.27, con y sin metástasis respectivamente). En ambos casos se

han observado niveles superiores en pacientes con metástasis, hallazgo concordante con lo publicado por otros autores. En el estudio realizado por Takahashi N. et al., se encontró asociación entre el aumento de solEng y metástasis en 101 pacientes con cáncer de varios tumores sólidos, la asociación fue detectada en pacientes con cáncer de mama y CCR. Concluyen que el aumento de Eng en suero se origina en la formación de neovasos de los tumores y que el proceso metastásico es dependiente de la angiogénesis, pudiendo emplear la Eng como marcador para monitorizar los primeros signos de metástasis (Takahashi N. et al., 2001).

Respecto a la evolución de los niveles de solEng, medidos a los 3, a los 6 y a los 9 meses nos hemos encontrado con dos obstáculos que nos impiden analizar bien su significado. Por un lado, el hecho de que sea el primer estudio con esta metodología, no se ha encontrado ningún estudio que midiese los niveles postoperatorios en tres momentos distintos y tan distanciados entre sí. Por otro lado, el hecho ya descrito en numerosos artículos de que la quimioterapia ejerce un efecto supresor en el suero, disminuyendo los niveles de Endoglina soluble. De tal forma que los niveles de solEng en los tumores más agresivos comparados con los menos agresivos se han visto sesgados porque salvo puntuales excepciones todos han recibido adyuvancia con quimioterapia en nuestro estudio. Del mismo modo ocurre cuando comparamos la evolución de los niveles en pacientes con y sin metástasis. En el caso concreto de pacientes con cáncer de recto y metástasis, se observa que, a pesar de mantener niveles más elevados durante todo el seguimiento, los niveles disminuyen de forma estadísticamente significativa a los 6 meses. Los pacientes con cáncer de colon y metástasis alcanzan igualmente su nivel más bajo a los 6 meses.

Este efecto supresor puede representar un problema a la hora de emplear la solEng para fines diagnósticos, limitando su uso como marcador de recurrencia tumoral y a distancia en un seguimiento a largo plazo en pacientes que no hayan recibido quimioterapia. Se ha planteado, pero no realizado, el consenso de valores de referencia, tanto basales en sujetos sanos como en pacientes con cáncer en el preoperatorio y tras recibir tratamiento, ya sea resección tumoral y/o quimioterapia, con el objetivo de emplear la Endoglina soluble como marcador de recurrencia a largo plazo en pacientes con cáncer.

CONCLUSIONES

1. La expresión génica del VEGF es más fuerte que la de Endoglinina en el tejido tumoral, tanto en cáncer de recto como en cáncer de colon por lo que puede ser considerado un buen marcador tumoral de angiogénesis en el CCR.
2. Los niveles de VEGF soluble pueden ser un indicador de la evolución de pacientes con CCR tras la intervención quirúrgica. Los estadios menos agresivos en relación con mejor pronóstico disminuyen sus niveles paulatinamente, al contrario que tumores en estadios más agresivos donde se observa aumento de los niveles plasmáticos a lo largo del tiempo.
3. La Endoglinina tiene una mayor expresión en el endotelio vascular del tejido tumoral en estadios más agresivos del CCR observada mediante IHQ por tinción específica. En estadios menos agresivos su expresión predomina en el epitelio cólico, en las membranas de los túbulos.
4. La mayor expresión de Endoglinina en el endotelio vascular de tumores más agresivos sumada a la existencia de metaloproteasas (específicamente la MMP-14), promueve la escisión de la Endoglinina y se traduce en niveles elevados de Endoglinina soluble en plasma.
5. La Endoglinina soluble puede ser empleada para monitorizar los primeros signos de metástasis dado que los niveles preoperatorios de pacientes con metástasis son superiores a los de pacientes sin metástasis de forma estadísticamente significativa.
6. La Endoglinina soluble como indicador evolutivo no es un buen marcador porque se ve ampliamente afectado por el tratamiento adyuvante con quimioterapia.

BIBLIOGRAFÍA

- Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M, Abe T. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery*. 2002 Jan;131(1 Suppl): S109-13.
- Atkin W, Dadswell E, Wooldrage K, Kralj-Hans I, von Wagner C, Edwards R et al. SIGGAR investigators. Computed tomographic colonography versus colonoscopy for investigation of patients with symptoms suggestive of colorectal cancer (SIGGAR): a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2013 Apr 6;381(9873):1194-202.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Cell biology and metabolism: Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of Multiple Members of the Transforming Growth Factor- β Superfamily Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Recept. *J Biol Chem*. 1999;274(2):584-594.
- Bellón T, Corbí A, Lastres P, Calés C, Cebrián M, Vera S, Cheifetz S, Massagué J, Letarte M, Bernabéu C. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol*. 1993; 23:2340-2345.
- Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2009;1792(10):954-973.
- BessaCaserras X, Jover Martínez R. Capítulo 31: Cancer Colorrectal. [Libro en Internet]. Madrid: Asociación Española de Gastroenterología (AEG) 2011. Disponible en: <http://www.elsevierinstituciones.com/ficheros/booktemplate/Capitulo31.pdf>.
- Beştaş R, Kaplan MA, Işıkdoğan A. The correlation between serum VEGF levels and known prognostic risk factors in colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2014 Mar-Apr;61(130):267-71.
- Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia (Bucur)*. 2012;107(5):555-563.
- Bossi P, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations. *Cancer Res*. 1995 Nov 1;55(21):5049-53.

- Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical Activity and Risks of Proximal and Distal Colon Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2012;104(20):1548-1561.
- Brenner H, Hoffmeister M, Stegmaier C, Brenner G, Altenhofen L, Haug U. Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: estimates based on 840, 149 screening colonoscopies. *Gut.* 2007 Nov;56(11):1585-9.
- Bressler B, Paszat LF, Chen Z, Rothwell DM, Vinden C, Rabeneck L. Rates of new omitted colorectal cancers after colonoscopy and their risk factors: a population-based analysis. *Gastroenterology.* 2007 Jan;132(1):96-102.
- Broll R, Erdmann H, Duchrow M, Oevermann E, Schwandner O, Markert U, Bruch HP, Windhövel U. Vascular endothelial growth factor (VEGF)--a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? *Eur J SurgOncol.* 2001 Feb;27(1):37-42.
- Bruhn MA, Townsend AR, Khoon Lee C, Shivasami A, Price TJ, Wrin J, Arentz G, Tebbutt NC, Hocking C, Cunningham D, Hardingham JE; BHI in collaboration with AGITG. Proangiogenic tumor proteins as potential predictive or prognostic biomarkers for bevacizumab therapy in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2014 Aug 1;135(3):731-41.
- Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 1995 Dec;1(12):1623-34.
- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cellular and Molecular Medicine.* 2005;9(4):777-94.
- Castells A., Marzo-Castillejo, M., Mascort, J., Amador, F., Andreu, M., Bellas, B. et al. (2009) Guía de práctica clínica. Prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2009. *Gastroenterol Hepatol* 2009: 717. e711–717.e758.

- Charles J. Kahi, C. Richard Boland, Jason A. Dominitz, Francis M. Giardiello, David A. Johnson, Tonya Kaltenbach et al. Colonoscopy Surveillance After Colorectal Cancer Resection: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2016; 150:758–768.
- Chiara Barozzi, Ph.D. Matteo Ravaioli, M.D. Antonia D’Errico, M.D. Gian Luca Grazi, M.D. Gilberto Poggioli, M.D. Giulia Cavrini, Ph.D. Alighieri Mazziotti, M.D. Walter Franco Grigioni, M.D. Relevance of Biologic Markers in Colorectal Carcinoma A Comparative Study of a Broad Panel. *Cancer*. 2002 Feb 1;94(3):647-57.
- Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). Colon Cancer Version 2.2016.
- Codina A., Farres R., Olivet F., Martin A., Pujadas M., Gómez N. Bergkvist D.J., Ortiz R. Resultados clínico-oncológicos de la respuesta patológica completa en el cáncer de recto después de tratamiento neoadyuvante. 2013. *Cir Esp*; 91 (7): 417-423.
- Dassoulas K, Gazouli M, Theodoropoulos G, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(5):703-708.
- De la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):769-80.
- Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg. The Hallmarks of Cancer Review. *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003 Jun;17(9):984-92.
- Edges SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-1474.
- European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition. IARC 2010.
- Farshad Nassiri, Michael d. Cusimano, Bernd W. Scheithauer, Fabio Rotondo, Alessandra Fazio, George M. Yousef, Luis V. Syro, Kalman Kovacs and Ricardo V. Lloyd. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Research* 2011; 31: 2283-2290.

Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*. 2011;22(9):1958-1972.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. Las Cifras Del Cáncer En España 2014.

Fernández-L A, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabéu C, Botella LM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* 2006 Mar;4(1):66-78.

Fernandez-Lopez A., Eva M. Garrido-Martin, Francisco Sanz-Rodriguez, Miguel Pericacho, Alicia Rodriguez-Barbero, Nelida Eleno, Jose M. Lopez-Novoa, Anette Duwell, Miguel A. Vega, Carmelo Bernabeu and Luisa M. Botella. Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Human Molecular Genetics*, 2007, Vol. 16, No. 13 1515–1533

Fernández-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet*. 1993;64(3-4):204-7.

Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Jun;15(6):385-403.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Jun 15;161(2):851-8.

Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):795-803.

Finlay A Macrae, Johanna Bendell. Clinical presentation, diagnosis, and staging of colorectal cancer. In: Up to Date 2017. Waltham MA, 2007 Version 53.0.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285:1182-1186.

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(1):4-6.

- Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg.* 1995 Dec;222(6):695-9.
- García-Pozo L, Miquilena-Colina ME, Lozano-Rodríguez T, García-Monzón C. Endoglin: estructura, funciones biológicas y papel en la fibrogénesis. *Rev Española Enfermedades Dig.* Española 2008;355-360.
- Glinghammar B, Rafter J. Carcinogenesis in the colon: interaction between luminal factors and genetic factors. *Eur J CancerPrev.* 1999, Suppl 1: S87-94
- Gomceli I, Tez M, Bostanci EB, Turhan N, Kemik AS, Akoglu M. Preoperative serum levels of soluble endoglin for prediction of recurrence in stage III colorectal cancer patients. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2012;55(2):74-7.
- Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int.* ;2015: 149014.
- Gougos et Letarte. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. 1988
- Grady WM, Pritchard CC. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *ToxicolPathol.* 2014 Jan; 42(1):124-39.
- Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica de prevención del cáncer colorrectal. Guía de práctica clínica. Barcelona: Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano; 2004. Programa de Elaboración de Guías de Práctica Clínica en Enfermedades Digestivas, desde la Atención Primaria a la Especializada: 4
- Gurzu S, Jung J, Azamfirei L, Mezei T, Cîmpean AM, Szentirmay Z. The angiogenesis in colorectal carcinomas with and without lymph node metastases. *Rom J Morphol Embryol.* 2008;49(2):149-52.
- Habr-gama, A., Perez, R. O., & Julião, G. P. S. Nonoperative Approaches to Rectal Cancer: A Critical Evaluation. *Semin Radiat Oncol.* 2011; 21(3): 21:234-239.

- Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2010 May 15;70(10):4141-50.
- Hormbrey E, Gillespie P, Turner K, Han C, Roberts A, McGrouther D, Harris AL. A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: is the current literature meaningful? *Clin Exp Metastasis.* 2002;19(8):651-63.
- J. Ruiz-Tovar, J. Jiménez Miramón, A. Valle, M. Limones. Resección endoscópica de cáncer colorrectal temprano como único tratamiento. *RevEspEnfermDig.* 2010; 102 (7): 435-441.
- Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD, Menck HR, Winchester DP. The National Cancer Data Base. Report on colon cancer. *Cancer.* 1996; 78(4):918-926.
- Jonker L. TGF- β & BMP Receptors Endoglin and ALK1: Overview of their Functional Role and Status as Antiangiogenic Targets. *Microcirculation.* 2014;21(2):93-103.
- Kahi CJ, Boland CR, Dominitz JA, Giardiello FM, Johnson DA, Kaltenbach T, Lieberman D, Levin TR, Robertson DJ, Rex DK. Colonoscopy Surveillance After Colorectal Cancer Resection: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. United States Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2016 Mar; 150(3):758-768.e11.
- Karahalios A., English DR, Simpson J A. Weight Change and Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol.* 2015;181(11):832-845.
- Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Baibas N, Polychronidis A, Simopoulos C, Karatzas G. Clinical significance of preoperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colorectal cancer and the effect of tumor surgery. *Surgery.* 2002 May; 131(5):548-55.
- Kassouf W, Ismail HR, Aprikian AG, Chevalier S. Whole-mount prostate sections reveal differential endoglin expression in stromal, epithelial, and endothelial cells with the development of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2004;7(2):105-10.

- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):841-4.
- Kut C, Mac Gabhann F, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer*. 2007 Oct 8;97(7):978-85.
- Le Marchand, L., Wilkens, L. R., Kolonel, L. N., Hankin, J. H., & Lyu, L. C. Associations of sedentary life style, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer research* 1997;57(21), 4787-4794.
- Lebrin F, Goumans M-J, Jonker L, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J*. 2004;23(20):4018-4028.
- Lee S. Rosen & Michael S. Gordon & Francisco Robert & Daniela E. Matei. Endoglin for Targeted Cancer Treatment. *Curr Oncol Rep* (2014) 16:36
- Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE, Abdalla S, Renehan A, O'Dwyer ST, Haboubi N, Kumar S. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br J Cancer*. 2003 May 6; 88(9):1424-31.
- Li C1, Guo B, Bernabeu C, Kumar S. Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech*. 2001 Feb 15;52(4):437-49.
- Li C1, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2000 Mar 20; 89(2):122-6.
- Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergström R, Glimelius B. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 1996 Feb;14(2):461-6.
- Liu Z, Zhang Y, Niu Y, Li K, Liu X, Chen H, Gao C. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLoS One*. 2014 Aug 8;9(8): e103910.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(33):5313-5327.

- Los M, Roodhart JML, Voist EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and valanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *Oncologist* 2007; 12: 443-450.
- MacGregor, T. P., Maughan, T. S., Sharma, R. A. (2012). Pathological grading of regression following neoadjuvant chemoradiation therapy: the clinical need is now. *J Clin Pathol.* 2012; 65(10): 867–871.
- Marina De Rosa, Ugo Pace, Daniela Rega, Valeria Costabile, Francesca Duraturo, Paola Izzo and Paolo Delrio. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncology Reports* 2015; 34: 1087-1096.
- Martin Oft, Karl-Heinz Heider and Hartmut Beug. TGF β signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and Metástasis. *Current Biology* 1998, 8:1243–1252.
- Martinovic Z, Kovac D, Martinovic M. Prognostic Significance of Microvessel Density Determining by Endoglin in Stage II Rectal Carcinoma: A Retrospective Analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 2015; 2015:504179.
- Myśliwiec P, Piotrowski Z, Zalewski B, Kukliński A, Pawlak K. Plasma VEGF-A and its soluble receptor R1 correlate with the clinical stage of colorectal cancer. *RoczAkad Med Białymst.* 2004;49 Suppl 1:85-7.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13(1):9-22.
- Oh SP, Seki T, Goss K a, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Current Biology.* 2000;97(6):2626-2631.
- Pérez-Gómez E, del Castillo G, Santibáñez JF, Lêpez-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M. The Role of the TGF- β Coreceptor Endoglin in Cancer. *Sci World J.* 2010; 10:2367-2384.
- Pérez-Gómez E, Eleno N, López-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabéu C, Quintanilla M. Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 2005; 24:4450-4461

- Prall F, Gringmuth U, Nizze H, Barten M. Microvessel densities and microvascular architecture in colorectal carcinomas and their liver metastases: significant correlation of high microvessel densities with better survival. *Histopathology*. 2003 May; 42(5):482-91.
- Programa PreveColon-Madrid (Detección Precoz de Cáncer de Colon y Recto de la Comunidad de Madrid)
- Protocolo de cáncer de recto. Hospital Universitario La Paz (Sección de Coloproctología)/UAM. 2016.
- Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, Batlle JF. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev OncolHematol*. 2017 Jan; 109:9-19.
- Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2005 Sep;36(9):955-61.
- Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2004 Feb;17(2):197-203.
- Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North*. 1996; 25:117-135.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25;219(4587):983-5.
- Shantha Kumara, Daniel Feingold, Matthew Kalady, Nadav Dujovny, Anthony Senagore, Neil Hyman, Vesna Cekic, and Richard L. Whelan. Colorectal Resection is Associated with Persistent Proangiogenic Plasma Protein Changes. Postoperative Plasma Stimulates In Vitro Endothelial Cell Growth, Migration, and Invasion. *Annals of Surgery* 2009; 249 (6)
- Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev*. 2010 Nov;24(6):203-19.

- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398):843-5.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29.
- Svagzdys S, Lesauskaite V, Pavalkis D, Nedzelskiene I, Pranys D, Tamelis A. Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer*. 2009 Mar 26; 9:95.
- Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3):524-32.
- Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK. Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3):524-32.
- Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yamada T, Hanaoka N, Inui K, Wada H. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res*. 2001 Nov;7(11):3410-5.
- Ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*. 2008; 11:89-89.
- Ten Dijke P, Hill CS New insight into TGF-beta-Smad signaling. *Trends Biochem Sci*. 2004. 29:265-273.
- Ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH (1994). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science*. 264:101-104.
- Terry P, Giovannucci E, Michels KB, et al. Fruit, Vegetables, Dietary Fiber, and Risk of Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(7):525-533.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.

- US Preventive Services Taskforce. Recommendation Statement. Screening for Colorectal Cancer. *JAMA*. 2016;315(23):2564-2575
- Vanesa Garcia, Jose M. Garcia, Javier Silva, Cristina Peña, Gemma Dominguez, Yolanda Lorenzo, Raquel Diaz, Isabel Alonso, Antonio Colas, Alicia Hurtado, Antonio Sanchez, Felix Bonilla. Levels of VEGF-A mRNA in plasma from patients with colorectal carcinoma as possible surrogate marker of angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* (2008) 134:1165–1171
- Violetta Dymicka-Piekarska, Katarzyna Guzinska-Ustymowicz, Adam Kuklinski, Halina Kemon. Prognostic significance of adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and VEGF in colorectal cancer patients. *Thrombosis Research* 129 (2012) e47–e50
- Volgstein ERF and B. A Genetic Model for Colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61:759-767.
- Wang Y, Yao X, Ge J, Hu F, Zhao Y. Can vascular endothelial growth factor and microvessel density be used as prognostic biomarkers for colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Scientific World Journal*. 2014; 2014:102736.
- Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005 Sep 22;437(7058):497-504.
- Werther K, Christensen IJ, Nielsen HJ; Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 2002 Feb 1;86(3):417-23.
- Werther K, Sørensen S, Christensen IJ, Nielsen HJ; Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. Circulating vascular endothelial growth factor six months after primary surgery as a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2003;42(8):837-45.

ANEXOS

ANEXO 1: Consentimiento informado del proyecto de investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Título del Proyecto de Investigación: ***Determinación de la Endoglin (CD105) como factor de diseminación y recurrencia en el cáncer colorrectal***

Promotor : - **Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ)**

Yo (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Dra María Isabel Prieto Nieto (Servicio Cirugía General)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FECHA :

FECHA :

ANEXO 2: Hoja de información al paciente

Hospital Universitario La Paz
Paseo de La Castellana, 261
Edificio Escuela de Enfermería, 4ª Planta
28046 - Madrid



Hospital Universitario La Paz

Comunidad de Madrid

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE**Proyecto de investigación:**

Endoglina y cáncer colorrectal. Implicación del marcador molecular en el pronóstico del cáncer colorrectal.

Investigador principal: Dra. Isabel Prieto Nieto (Servicio Cirugía General)

Promotor: Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ)

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, con financiación y apoyo del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ) y el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), cuyo objetivo principal es estudiar la implicación de la molécula Endoglina en el cáncer colorrectal.

La Endoglina (CD105) es una glicoproteína homodimérica transmembrana que se expresa fundamentalmente en células endoteliales (arterias, venas y capilares). Su expresión se ve aumentada en zonas donde se está produciendo una angiogénesis activa, en zonas donde hay lesión vascular, en el endotelio de algunas patologías de la piel, en enfermedades autoinmunes y en la angiogénesis tumoral. Su expresión no se limita al endotelio de la pared vascular, pudiendo encontrarla también en fibroblastos del estroma perivascular y en células del músculo liso vascular. También se pueden encontrar bajos niveles de la proteína soluble en plasma, libre o unida a TGF- β 1, en ciertas patologías como en diversos tipos de cáncer, leucemia mieloide aguda o desórdenes mieloproliferativos crónicos pueden encontrarse niveles elevados.

Existen numerosos estudios que relacionan la endoglina con la progresión tumoral de diversos tumores utilizándola como factor pronóstico. El objetivo de nuestro estudio es conocer la implicación de esta molécula en el pronóstico del cáncer colorrectal, poco

estudiado hasta el momento actual a diferencia de otros tumores como el de mama, ovario o pulmón donde está más definido su papel.

En este estudio participa el Servicio de Cirugía General del Hospital la Paz, el Biobanco del Hospital La Paz y el Centro de Investigaciones Biológicas, con el apoyo del Servicio de Anatomía Patológica y Oncología de nuestro hospital.

Se estima que participen aproximadamente 200 pacientes, a cada paciente se le extraerá una muestra de plasma el mismo día de la cirugía mientras se encuentre anestesiado y posteriormente a los 3, 6 y 9 meses en los sucesivos controles por parte de Oncología, en el Hospital de Día de Oncología. Igualmente se tomará una muestra de tejido del segmento de colon o de recto extraído durante la cirugía y enviado a analizar por el Servicio de Anatomía Patológica.

Antes de que usted de su consentimiento firmado es necesario que entienda bien en qué consiste su participación. Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo, conocer la implicación que la Endoglina tiene en el cáncer colorrectal contribuirá a un mejor conocimiento del pronóstico del mismo basado en marcadores tumorales y puede permitir en un futuro abrir nuevas líneas de investigación sobre nuevos tratamientos.

Le rogamos lea detenidamente este documento y no dude en ponerse en contacto con su médico para cualquier pregunta que le pueda surgir acerca del mismo y/o de la información sobre el estudio que le damos a continuación. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que Ud. precise y la relación con el Equipo Médico que le atiende no va a verse afectada. Ud. debe saber que la cirugía que se le ha programado no sufrirá ninguna variación.

Usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando si acepta formar parte de este estudio y firmando este documento, antes de la intervención quirúrgica. Como voluntario participante de la investigación, tiene derecho a conocer los resultados finales del estudio, Los datos que se obtengan del estudio le serán comunicados a Ud. si así lo solicita. Los resultados serán analizados por grupos o subgrupos de científicos. Se le garantiza la absoluta confidencialidad de los datos obtenidos del estudio que pudieran relacionarse con

usted. Así mismo, se le informará de cualquier nuevo hallazgo que pueda influir en su decisión de permanecer en el estudio.


Todos sus datos personales serán tratados de forma confidencial de acuerdo a la LOPD 15/1999 y los derechos que conlleva de acceso, rectificación, cancelación y oposición de los datos (Derecho ARCO), de tal forma que se le asignará un código alfa numérico y solo el equipo del Hospital la Paz del grupo investigador conocerá esta codificación. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias, y eventualmente, la comunidad científica través de congresos y/o publicaciones científicas salvaguardando siempre la confidencialidad de sus datos personales.

El estudio está aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital, que podrá auditar el estudio para comprobar que se está realizando de acuerdo al protocolo aprobado.

Si usted precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con la Investigadora principal, la Dra. Isabel Prieto, del Servicio Cirugía General.

Muchas gracias por su colaboración.

ANEXO 3: Consentimiento informado del Biobanco

	<p align="center">FORMULARIO</p> <p align="center">CONSENTIMIENTO INFORMADO GENERAL DE BIOBANCO PARA LA OBTENCIÓN/CESIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO Y DATOS ASOCIADOS</p>	<p>Código: CI Biobanco</p> <p>Revisión: 5</p> <p>Fecha: 09/12</p> <p>Página 1 de 2</p>
---	--	--

HOJA DE INFORMACIÓN	
<p>Usted está siendo atendido en un Hospital Universitario, por ello se le invita a donar parte del excedente del material biológico (muestras o partes de su cuerpo) resultante de la intervención a la que se va a someter. Si usted acepta, dicho material se guardará en el Biobanco IdiPAZ con el propósito de ser cedido para fines docentes y científicos, según dispone al respecto la legislación vigente, con el objetivo de intentar contribuir al mejor conocimiento de las enfermedades y lograr avanzar en su diagnóstico y tratamiento.</p> <p>Se le pide su consentimiento para realizar el almacenamiento y uso de dicho material por un tiempo indefinido, durante el cual estará disponible para la realización de diferentes proyectos de investigación, científica y éticamente evaluados por los Comités externos del Biobanco, a desarrollar tanto en el Hospital Universitario "La Paz" como en otros Centros. Además, sus muestras estarán reversiblemente disociadas, por lo que su identidad estará protegida, pues cada muestra se identificará con un código y nunca el grupo científico que lleve a cabo la investigación podrá asociar su identidad con el código asignado, aunque podría conocerse, si fuera necesario, utilizando dicho código.</p> <p>Los resultados serán analizados por grupos de investigadores y expertos y podrán ser comunicados en reuniones, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniéndose la confidencialidad.</p> <p>Su colaboración es voluntaria y gratuita, por lo que renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los potenciales beneficios que puedan derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras que cede para investigación.</p> <p>Usted es libre de solicitar en cualquier momento la revocación del consentimiento para utilizar sus muestras, pudiendo solicitar la destrucción o anonimización (destrucción del código que vincula la muestra con su identidad) de las mismas. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma. Asimismo tiene derecho a incluir las restricciones que desee respecto del uso de sus muestras.</p> <p>Tiene a su disposición toda la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen sus muestras. Asimismo, el Comité de Ética externo al Biobanco IdiPAZ, así como el Comité de Ética de la Investigación, que evaluó en su caso el Proyecto de Investigación, decidirán en qué ocasiones será imprescindible que se le envíe la información de manera individualizada, siempre que usted lo haya autorizado. En este caso, el Biobanco IdiPAZ podrá ponerse en contacto con usted para solicitarle información u otras muestras.</p> <p>Tiene derecho a conocer los datos genéticos con relevancia clínica que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, que serán conservados durante un periodo mínimo de cinco años, según exige la Ley, al igual que los resultados obtenidos en los distintos proyectos de investigación para los que se haya utilizado su muestra, siempre que así lo desee.</p> <p>También es posible que se produzcan descubrimientos inesperados que pudieran tener trascendencia para su salud por lo que tiene derecho a decidir si desea que le sean o no comunicados. Igualmente, la información que se obtenga también pudiera ser relevante para la salud de sus familiares, siendo, por tanto, conveniente que les transmita la información obtenida; no obstante, es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro. Según prevé la Ley, cuando esta información a criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta del comité asistencial si lo hubiera. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para estas finalidades.</p> <p>En el supuesto de un eventual cierre del Biobanco IdiPAZ o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.</p> <p align="center">Firma del donante:</p>	

Esta Hoja de Información acredita con su firma que ha sido informado de su contenido y que consiente y suscribe en todo lo que en ella se contiene; se expide en tres ejemplares, uno de ellos es para usted, otro se conservará en el Biobanco IdiPAZ y el otro en el Centro donde se obtuvo su muestra.

No dude en recabar más información o en hablar con su médico para aclarar cualquier duda en cualquier momento.

Sus muestras y los datos asociados a las mismas pasarán a formar parte del fichero del Biobanco IdiPAZ, inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuyo responsable es la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ).

Para mayor facilidad en el ejercicio de sus derechos de acceso, oposición, rectificación y de cancelación de sus datos, así como para el ejercicio de sus derechos a solicitar la retirada, destrucción o anonimización de sus muestras y/o datos y los demás que se expresan en el presente documento puede ponerse en contacto directamente con el Biobanco IdiPAZ (1ª planta Hospital Maternal, Pº de la Castellana, 261, Madrid), a través del teléfono 912071191 o en la dirección de correo electrónico: biobanco_hulp@salud.madrid.org.

D./Dª con D.N.I., DECLARO
QUE:

1. He leído, he sido informado y comprendo el contenido de la presente hoja de Información, lo que acredito con mi firma en prueba de mi consentimiento en todo lo que en ella se contiene. SI ☐ NO ☐
2. He preguntado y aclarado las posibles dudas al Dr./Dra.....
3. Entiendo que mi participación es voluntaria y gratuita y comprendo que puedo solicitar la revocación de este consentimiento en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos presentes y/o futuros. SI ☐ NO ☐
4. Autorizo el almacenamiento y uso del material biológico indicado en el Biobanco IdiPAZ. SI ☐ NO ☐
5. Autorizo, cuando sea preciso, a que se pongan en contacto conmigo para solicitar información adicional o para recibir información relevante para mi salud o la salud de mis familiares derivada de la investigación.
SI ☐ NO ☐
6. Autorizo que se consulte mi historia clínica, cuando sea imprescindible para la realización del proyecto para el que se soliciten las muestras y previa autorización del Comité de Ética del Biobanco IdiPAZ.
7. No deseo que mis muestras se usen en proyectos de investigación que tengan que ver con.....

En a de de 20.....

DONANTE	PERSONA QUE INFORMA
Firma:	Dr/a col..... Servicio..... En a de de 20..... Firma:

ANEXO 4: Declaración de Helsinki

El ensayo clínico llevado a cabo se rige por los principios de la Declaración de Helsinki, descrita a continuación.

La declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial fue adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial de Helsinki, Finlandia en Junio de 1964; y enmendada por la 19ª Asamblea Médica Mundial de Tokio, Japón, en Octubre de 1975; 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia Italia en Octubre de 1983; 41ª Asamblea Médica Mundial de Hong Kong, Septiembre de 1989; 48ª Asamblea General de Somerset West, Sudáfrica en Octubre de 1996; 52ª Asamblea General en Edimburgo, Escocia, en Octubre de 2000; Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la Asamblea Médica Mundial en Washington en 2002; Nota aclaratoria del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la Asamblea Médica Mundial en Tokio en 2004 y la 59ª Asamblea General en Seúl, Corea en Octubre de 2008.

Introducción

1. La Asociación Médica Mundial ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para la investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables. La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar el resto de párrafos pertinentes.

2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la Asociación Médica Mundial insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos, a adoptar estos principios.

3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de este deber.

4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula “Velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente” y el Código Internacional de la Ética Médica afirma que: “El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica”.

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudio en los seres humanos. Las poblaciones que estén subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación de la investigación.

6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre otros intereses.

7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.

9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y los derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.

10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya el nivel o elimine cualquier medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

Principios básicos para toda investigación médica

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

12. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generales aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos

de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

13. Al realizar la investigación médica en seres humanos, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.

14. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir la información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio t estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosa en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiados.

15. El protocolo debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas para esta Declaración. El comité tiene derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del Comité.

16. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personal que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de

la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

17. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.

18. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.

19. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

20. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

21. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en el ensayo.

22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona debe ser incluida en un estudio a menos que ella acepte libremente.

23. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.

24. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto perteneciente a la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho a participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también de los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestado formalmente.

25. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

26. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que no tenga nada que ver con aquella relación.

27. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y ésta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica solo un riesgo y costos mínimos.

28. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.

29. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física o mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Si dicho representante no está disponible y no se puede retrasarse la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que nos les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

30. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de los informes. Debe aceptar las normas éticas de entrega de información. Deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación deben citar las fuentes de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

Principios aplicables cuando la investigación médica se combina con la atención médica

31. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tan investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación

en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte de la investigación.

32. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias:

- El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.
- Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

33. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

34. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tiene relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

35. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar dichas intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ella da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando se a oportuno, puesta a disposición del público.